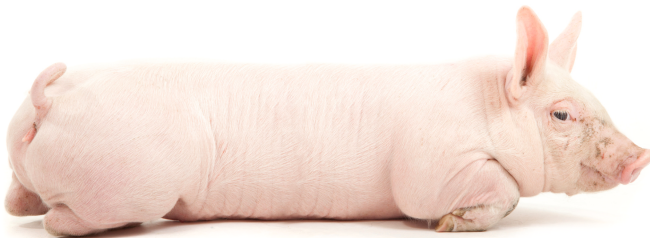


Maria Sophie Bonarius

Einfluss von phytogenen Futterkomponenten auf
ausgewählte Parameter der Stressantwort und des
Lipidstoffwechsels in der Leber beim Ferkel



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem
Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Klaus Eder

**Einfluss von phytoenen Futterkomponenten auf
ausgewählte Parameter der Stressantwort und des
Lipidstoffwechsels in der Leber beim Ferkel**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Maria Sophie Bonarius
Tierärztin aus Gießen

Gießen 2019

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Eder
2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Tag der Disputation: 30.01.2019

Für meine Omas
Elfriede und Gerda

Inhaltsverzeichnis

I Tabellenverzeichnis	VI
II Abbildungsverzeichnis	VIII
III Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Absetzen	2
2.2 Beschreibung stressresponsiver Signalwege auf molekularbiologischer Ebene.....	3
2.2.1 NF- κ B-Signalwege.....	3
2.2.2 Keap1-Nrf2-Signalweg	6
2.2.3 <i>Unfolded Protein Response</i> infolge von Stress im endoplasmatischen Retikulum	10
2.2.4 Interaktion der stressresponsiven Signalwege.....	15
2.2.4.1 Interaktion zwischen Nrf2 und NF- κ B.....	15
2.2.4.2 NF- κ B Aktivierung innerhalb der UPR.....	17
2.2.4.3 Rolle des Nrf2 in der UPR.....	18
2.3 Verknüpfung zwischen stressresponsiven Signalwegen und dem Lipidstoffwechsel.....	18
2.3.1 <i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha</i>	18
2.3.1.1 PPAR α im Inflammationsgeschehen.....	20
2.3.2 <i>Fibroblast growth factor 21</i>	21
2.4 Sekundäre Pflanzenstoffe	23

2.4.1 Polyphenole.....	23
2.4.1.1 Polyphenole in Trauben	23
2.4.1.2 Polyphenole in Hopfen.....	25
2.4.2 Ätherische Öle	27
3 Zielstellung.....	30
4 Material und Methoden.....	32
4.1 Versuchstiere und Futter.....	32
4.1.1 Versuchstiere und Futter im Ferkelversuch 1	32
4.1.2 Versuchstiere und Futter im Ferkelversuch 2	35
4.2 Probengewinnung	37
4.3 Materialien	37
4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien	37
4.5 Verwendete Reagenzien.....	38
4.6 Verwendete Puffer	40
4.7 Methoden	42
4.7.1 RNA-Isolation	42
4.7.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung.....	42
4.7.2 cDNA-Synthese	43
4.7.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	43
4.7.4 DNA-Gelelektrophorese	50
4.7.5 Isolation von Gesamtprotein	50
4.7.6 Nuklearextraktion.....	50

4.7.7 Proteinkonzentrationsbestimmung	51
4.7.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
4.7.9 <i>Western Blot</i>	53
4.7.10 Bestimmung von Retinol und Tocopherolen	55
4.7.11 Bestimmung von Triglyceriden	58
4.7.12 Bestimmung des antioxidativen Status	58
4.7.12.1 Herstellung des Leberhomogenats	58
4.7.12.2 <i>Trolox Equivalent Antioxidative Capacity</i>	59
4.7.12.3 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen	60
4.8 Statistische Auswertung	61
4.8.1 Statistische Auswertung der Daten aus dem Ferkelversuch 1	61
4.8.2 Statistische Auswertung der Daten aus dem Ferkelversuch 2	61
5 Ergebnisse	62
5.1 Ergebnisse aus Ferkelversuch 1	62
5.1.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Leistungsparameter von Ferkeln	62
5.1.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Signalwege der Stressantwort in der Leber beim Ferkel	63
5.1.2.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den Nrf2- Signalweg in der Leber beim Ferkel	63
5.1.2.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den NF- κ B- Signalweg in der Leber beim Ferkel	66
5.1.2.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die UPR in der Leber beim Ferkel	68

5.1.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf antioxidative Parameter in Plasma und Leber beim Ferkel	71
5.2 Ergebnisse aus Ferkelversuch 2	72
5.2.1 Einfluss von ätherischen Ölen auf Leistungsparameter von Ferkeln	72
5.2.2 Einfluss von ätherischen Ölen auf Signalwege der Stressantwort und des Fettstoffwechsels in der Leber beim Ferkel	75
5.2.2.1 Einfluss von ätherischen Ölen auf den Nrf2-Signalweg in der Leber beim Ferkel	75
5.2.2.2 Einfluss von ätherischen Ölen auf den NF- κ B-Signalweg in der Leber beim Ferkel	79
5.2.2.3 Einfluss von ätherischen Ölen auf die UPR in der Leber beim Ferkel	83
5.2.2.4 Einfluss von ätherischen Ölen auf die Fettsäuresynthese in der Leber beim Ferkel	91
5.2.2.5 Einfluss von ätherischen Ölen auf den PPAR α -Signalweg und den Carnitinstoffwechsel in der Leber beim Ferkel	94
6 Diskussion	99
6.1 Einfluss von phytogenen Futterkomponenten auf ER-Stress und Inflammation in der Leber beim Ferkel	100
6.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den antioxidativen Status in der Leber beim Ferkel	102
6.3 Einfluss von phytogenen Futterkomponenten auf den Fettstoffwechsel in der Leber beim Ferkel	104
6.4 Einfluss des Absetzens auf Parameter der Stressantwort und des Fettstoffwechsels in der Leber beim Ferkel.....	106
6.5 Einfluss von phytogenen Futterkomponenten auf die Leistungsparameter beim Ferkel.....	108

6.6 Schlussfolgerung	110
7 Zusammenfassung.....	112
8 Summary	114
9 Literaturverzeichnis	116
10 Ehrenwörtliche Erklärung	157
11 Danksagung	158

I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Futtergrundmischungen für den Ferkelversuch Hopfen/Traubentrester nach den Empfehlungen der GfE, 2006.....	34
Tabelle 2: Zusammensetzung der Futtergrundmischungen für den Ferkelversuch ätherische Öle nach den Empfehlungen der GfE, 2006	36
Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese	43
Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermixes für die qPCR	44
Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer der Referenz- und Zielgene für die qPCR.....	45
Tabelle 6: Expressionsstabilität der 3 stabilsten Referenzgene (M-Werte) gemäß GeNorm.....	50
Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.....	52
Tabelle 8: Eigenschaften der verwendeten Antikörper für den Western Blot.....	54
Tabelle 9: Volumina der Probenansätze für die HPLC zur Bestimmung der Retinol- und Tocopherolgehalte in Plasma und Leber	55
Tabelle 10: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Retinol- und Tocopherolgehalte in Plasma und Leber	56
Tabelle 11: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Leistungsparameter beim Ferkel	62
Tabelle 12: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber	64
Tabelle 13: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Zielgenen des Fremdstoffmetabolismus in der Leber	64

Tabelle 14: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten NF- κ B-Zielgenen in der Leber	66
Tabelle 15: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten ER-Stress-Zielgenen in der Leber	69
Tabelle 16: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf antioxidative und biochemische Parameter im Plasma	71
Tabelle 17: Einfluss von ätherischen Ölen auf Leistungsparameter beim Ferkel.....	73
Tabelle 18: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber beim Ferkel	76
Tabelle 19: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten NF- κ B-Zielgenen in der Leber beim Ferkel	80
Tabelle 20: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten ER-Stress-Zielgenen in der Leber beim Ferkel	85
Tabelle 21: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber beim Ferkel	88
Tabelle 22: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Zielgene der Fettsäuresynthese in der Leber beim Ferkel	92
Tabelle 23: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Zielgene des PPAR α und des Carnitinstoffwechsels in der Leber beim Ferkel	96

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassischer (a) und alternativer (b) NF- κ B Signalweg	5
Abbildung 2: Aufbau der Proteine Nrf2 und Keap1	8
Abbildung 3: Der Keap1/Nrf2 Signalweg	10
Abbildung 4: Signalwege der UPR beim Säugetier	14
Abbildung 5: Mechanismus der Transkriptionsregulation durch PPAR α	20
Abbildung 6: Grundstruktur der Flavone (a) und Flavanole (b)	24
Abbildung 7: Strukturformel des Xanthohumols	26
Abbildung 8: Isopren (a) als Grundgerüst der Terpene und Zimtaldehyd (b) als Vertreter der Phenylpropane	28
Abbildung 9: Beispielhafte HPLC-Chromatogramme der Vitamin A und E Bestimmungen	57
Abbildung 10: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relative Proteinkonzentration der NQO1 im Gesamtprotein der Leber	65
Abbildung 11: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relative Proteinkonzentration von NF- κ B p50 im Nuklearprotein der Leber	67
Abbildung 12: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen Proteinkonzentrationen von total PERK und phospho-PERK im Gesamtprotein der Leber	70
Abbildung 13: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relative Proteinkonzentration der GPX1 im Gesamtprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen	78
Abbildung 14: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relative Proteinkonzentration von NF- κ B p50 im Nuklearprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen	82

Abbildung 15: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relativen Proteinkonzentrationen von total PERK und phospho-PERK im Gesamtprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen	88
--	----

III Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ABTS	2,2-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat]
ACACA	<i>acetyl-CoA carboxylase alpha</i>
ACOX1	<i>acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl</i>
ACTB	<i>β-actin</i>
AKT	Protein kinase B (PKB)
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ASK1	<i>apoptosis-signal-regulating kinase 1</i>
ATF4	<i>activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>activating transcription factor 6</i>
ATF6f	<i>ATF6fragment</i>
ATP5G1	<i>ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)</i>
BAK1	<i>BCL2-antagonist/killer 1</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BBOX1	<i>butyrobetaine, 2-oxoglutarate dioxygenase 1'</i>
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BHT	<i>butylated hydroxytoluene</i>
BiP	<i>immunoglobulin heavy-chain binding protein</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BTB	<i>bric-à-brac, tramtrack, broad complex</i>
Ca	Calcium
CASP3	<i>caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP8	<i>caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CBF	<i>CCAAT-binding factor</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>

CCL2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CD36	<i>CD36 molecule</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHOP	<i>C/EBP-homologous protein</i>
CPT1A	<i>carnitine palmitoyltransferase 1A</i>
CRE	<i>ATF/cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CReP	<i>constitutive repressor of eIF2α phosphorylation</i>
C _t	<i>cycle treshold</i>
CTR	C-terminale Region
CUR	Curcumin
CYP1A2	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2</i>
CYP2E1	<i>cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1</i>
CYP3A29	<i>cytochrome P450 3A29</i>
CYP4A24	<i>cytochrome P450 4A24</i>
DBD	<i>DNA binding domain</i>
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGR	<i>double glycine repeats</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAJC3	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDEM1	<i>ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1-like</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF2 α	<i>eukaryotic translation initiation factor-2</i>
EM	Emissionswellenlänge
EpRE	<i>electrophile response element</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
ERSE	<i>ER stress response element</i>
EX	Anregungswellenlänge
FABP1	<i>fatty acid binding protein 1</i>
FASN	<i>fatty acid synthase</i>

FGF21	<i>fibroblast growth factor 21</i>
g	Gramm
GADD34	<i>growth arrest and DNA damage-inducible gene 34</i>
GADD153	<i>growth arrest and DNA damage-inducible gene 153</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GLS	<i>golgi localisation sequence</i>
GME	<i>grape seed and grape marc meal extract</i>
GPAT	<i>glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
GPI	<i>glucose-6-phosphate isomerase</i>
GPX1	<i>glutathione peroxidase 1</i>
GRP78	<i>glucose regulated protein 78</i>
GRP94	<i>glucose-regulated protein 94</i>
GSGME	<i>grape seed and grape marc meal extract</i>
GSTA1	<i>glutathione S-transferase alpha 1</i>
Hac1	<i>homologous to ATF/CREB1</i>
HMOX1	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>
HP	<i>haptoglobin</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSPA5	<i>heat shock 70kDa protein 5</i>
HSP90B1	<i>heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1</i>
I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IL	Interleukin
IKK	I κ B-Kinase
IRE	<i>inositol-requiring transmembrane kinase/endonucleases</i>
IVR	<i>intervening region</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Keap1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
kg	Kilogramm
LBD	<i>ligand binding domain</i>
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LR	<i>linker region</i>
mA	Milliampere

MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
ME	Metabolisierbare Energie
ME1	<i>malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic</i>
MEK	Methylethylketon
mg	Milligramm
MGST1	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>
ml	Milliliter
min	Minute
MJ	Megajoule
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Neh	<i>Nrf2-ECH homology</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
NTC	<i>nontemplate-control</i>
NTR	N-terminale Region
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEITC	Phenylethylisothiocyanat
PERK	<i>protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase</i>
PDIA4	<i>protein disulfide isomerase family A, member 4</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPP1R15A	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A</i>

PPP1R15B	<i>protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B</i>
PPRE	<i>peroxisome proliferator response elements</i>
PRDX6	<i>peroxiredoxin 6</i>
qPCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
RHD	<i>Rel homology domain</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPS9	<i>40S ribosomal protein S9-like</i>
RXR	<i>9-cis-retinoic acid receptor</i>
SAA2	<i>serum amyloid A2</i>
SD	Standardabweichung
SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
SDS	<i>sodium-dodecyl-sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SH	<i>spent hops</i>
SLC22A5	<i>solute carrier family 22, member 5</i>
SLC25A20	<i>solute carrier family 25, member 20</i>
SLC27A1	<i>solute carrier family 27, member 1</i>
SOD	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>
SREBF1	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>
SUL	Sulforaphan
SULT1A1	<i>sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1</i>
t	Tonne
TA	<i>annealing temperature</i>
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TBST	<i>tris buffered saline tween</i>
TEAC	<i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP	1,1,3,3-Tetraethoxypropan
TG	Triglyceride
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>

TRAF2	<i>TNF-receptor-associated factor 2</i>
TXNRD1	<i>thioredoxin reductase 1</i>
U	Umdrehungen
UGT1A1	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-1-like</i>
UGT1A2	<i>UDP-glucuronosyltransferase 1-6-like</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UPRE	<i>unfolded protein response element</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
XBP1s	<i>XBP1spliced</i>
XP	Rohprotein

1 Einleitung

Seit dem 1. Januar 2006 ist der Einsatz von Antibiotika als Wachstumsförderer in Futtermitteln in der Europäischen Union verboten. Hintergrund des Verbots ist das erhöhte Aufkommen bakterieller Resistenzen und der damit in Verbindung stehenden Gesundheitsgefährdung für Mensch, Tier und Umwelt. Antibiotika in Futtermitteln scheinen bei der Entwicklung von Antibiotikaresistenzen eine entscheidende Rolle zu spielen (Amezcu et al. 2002; Smith et al. 2010). Eingesetzt wurden antibiotische Wachstumsförderer zur Prävention subklinischer und klinischer Erkrankungen (Heo et al. 2013), da das Absetzen die kritischste Phase in der Schweineaufzucht darstellt. Insbesondere Infektionen und Diarrhoen treten vermehrt auf (Lalles et al. 2004).

Folgen des Verbots antibiotischer Wachstumsförderer sind eine Reduktion der Lebensqualität, verminderte Körpergewichte, geringere Futterverwertung, weniger Uniformität, sowie ein gesteigerter Einsatz therapeutischer Antibiotika (Pluske 2013). Im Interesse der Tiere und aufgrund wirtschaftlicher Aspekte ist es unerlässlich Alternativen/Ersatz für die Fütterungsantibiotika zu finden.

In der humanen Ernährung werden Früchten und Gemüse eine positive Beeinflussung der Gesundheit nachgesagt. Zurückgeführt wird dieser Effekt auf die darin enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen (Dillard und German 2000; Tyagi et al. 2010). Über ihren Einsatz als diätetische Ergänzungen in der Nutztierhaltung ist hingegen wenig bekannt. Dabei fallen bei der Verarbeitung pflanzlicher Lebensmittel häufig Nebenprodukte an, die eine kostengünstige Quelle für die Futtermittelindustrie darstellen. So fällt zum Beispiel bei der Produktion von Wein und Traubensaft Trester an, der reich an Polyphenolen ist. Polyphenolen werden antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen (Kris-Etherton et al. 2004; Han et al. 2007; El Gharras 2009; Xia et al. 2010; Li et al. 2014a). Zurückzuführen ist dies auf eine mögliche Aktivierung endogener Abwehrsysteme durch die Modulation zellulärer Signalwege. Diese werden über die Aktivität und Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert (Han et al. 2007).

2 Literaturübersicht

2.1 Absetzen

In der Europäischen Union werden Ferkel in der Regel im Alter von 28 Lebenstagen abgesetzt. Dies entspricht den rechtlich geltenden Mindestanforderungen (Kommission der Europäischen Gemeinschaft 2001). Dennoch stellt das Absetzen in der kommerziellen Schweineproduktion eines der stressigsten Ereignisse für die Tiere dar (Moeser et al. 2006; Campbell et al. 2013; Heo et al. 2013).

Stress ist die unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Art der Beanspruchung. Ein Stressor ist ein Agens, das zu jeder Zeit Stress hervorrufen kann (Selye 1976). In der Absetzphase wirken psychosoziale und physikalische Stressoren auf die Ferkel ein. Es treten abrupte Veränderungen in der Ernährung und in der Umwelt auf. Die Ferkel werden von der Sau separiert, transportiert, mit Ferkeln anderer Würfe konfrontiert und diätetischen Veränderungen und fremden Pathogenen ausgesetzt (Pluske et al. 1997; Lalles et al. 2004; Moeser et al. 2006; He et al. 2011; Campbell et al. 2013; Pluske 2013). Das Risiko für gastrointestinale Erkrankungen, Infektionen und Stoffwechselstörungen ist erhöht (Moeser et al. 2006; Lalles 2008; He et al. 2011). Unmittelbar nach dem Absetzen ist die Futteraufnahme oftmals reduziert und es treten keine oder nur geringe Gewichtszunahmen auf (Fenton et al. 1985; van Beers-Schreurs et al. 1992; Pluske et al. 1997; Lalles et al. 2004; Campbell et al. 2013). Gegenregulatorisch kommt es zur Fettmobilisation (Fenton et al. 1985).

Die Folge der veränderten nutritiven Versorgung sind physiologische Umgestaltungen der Struktur und der Funktion des Darms (Campbell et al. 2013). Kennzeichnend sind eine Zottenatrophie und Kryptenelongation im Dünndarm (Pluske et al. 1997; Boudry et al. 2004; Zhu et al. 2012). Montagne et al. (2007) stellten eine Gewichtsreduktion des Dünndarms um 18 % innerhalb der ersten zwei Tage der Absetzphase fest. Aufgrund der physiologischen Veränderungen sind die Absorptionsfähigkeit des Dünndarms und die Aktivität der Bürstensaumenzyme herabgesetzt. Resultierend ist eine negative Beeinflussung der Fütterungseffizienz (Pluske et al. 1997). Hinzu kommt ein mit dem Absetzen assoziiertes gesteigertes Inflammationsgeschehen, da die epitheliale Barrierefunktion nicht mehr ausreichend gewährleistet ist (Spreeuwenberg et al. 2001; Pié et al. 2004; Campbell et al. 2013). Durch Steigerung der Permeabilität

können Toxine, Bakterien und Antigene die Barriere überwinden. Resultierend sind Inflammation, Malabsorption, Diarrhö, sowie eine reduzierte Wachstumsrate (Campbell et al. 2013).

Des Weiteren haben Zhu et al. (2012) festgestellt, dass Absetzen oxidativen Stress auslösen kann. Oxidativer Stress ist definiert als eine Imbalance zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und der Eliminationskapazität protektiver Mechanismen (Reuter et al. 2010). Es kommt zur Schädigung zellulärer Makromoleküle, welche, wenn sie irreparabel sind, im Zelltod resultieren. Die Beeinflussung kann den gesamten Organismus betreffen. ROS sind an viele zelluläre Signalwege gekoppelt (Yin et al. 2013). Im Folgenden sind einige von diesen näher beschrieben.

2.2 Beschreibung stressresponsiver Signalwege auf molekularbiologischer Ebene

2.2.1 NF- κ B-Signalwege

Bei NF- κ B, *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*, handelt es sich um eine Transkriptionsfaktorenfamilie, die als Masterregulatoren im Hinblick auf die Immunantwort und bei Entzündungsprozessen gelten (Zheng et al. 2010). NF- κ B wurde erstmals 1986 als Kernfaktor in B-Zellen beschrieben (Sen und Baltimore 1986). Der Name wurde von seiner dortigen Funktion, der Steigerung der Transkription der Immunglobulin Kappa-Leichtketten, abgeleitet.

Beim Säuger umfasst die NF- κ B-Familie fünf Proteine: p65 (RelA), RelB und c-Rel, Subfamilie der Rel-Proteine, sowie p50/p105 (NF- κ B1) und p52/p100 (NF- κ B2), den NF- κ B-Proteinen. P65, RelB und c-Rel werden als transkriptionell aktive Proteine synthetisiert. NF- κ B1 und NF- κ B2 werden als 100 bzw. 105 kDa große Vorstufen synthetisiert, welche später in die aktiven Formen umgewandelt werden (May und Ghosh 1998; Gilmore 2006; Zheng et al. 2010; Sun und Andersson 2002). Charakteristisch ist die hochkonservierte N-terminale *Rel-homology domain* (RHD), bestehend aus 300 Aminosäuren. Über diese Domäne wird die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Interaktion mit den Inhibitorproteinen (I κ Bs) vermittelt. Außerdem enthält sie das *nuclear localization signal* (NLS) (Gilmore 1990; Ghosh et al. 1998; Sun und Andersson 2002; Hayden und Ghosh 2004). NF- κ Bs kommen als

Homo- oder Heterodimere vor. Das klassische NF- κ B Dimer besteht aus RelA und NF- κ B1 (Epstein et al. 1997; Pahl 1999).

In der unstimulierten Zelle ist NF- κ B im Zytosol lokalisiert. Reguliert wird diese Lokalisation bei den Rel-Proteinen über ein Inhibitorprotein I κ B bzw. im Falle der NF- κ B-Proteine über eine *I κ B-like* Domäne (Zheng et al. 2010). Die Inhibitorproteine werden ebenfalls zu einer Genfamilie zusammengefasst. Diese beinhaltet beim Säuger sieben Proteine: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 und die Vorstufen p100 und p105. Die I κ Bs weisen multiple Ankyrin Wiederholungen auf. Dabei handelt es sich um Protein-Protein-Interaktionsdomänen über die sie mit den RHD der NF- κ B Dimere interagieren (Ghosh et al. 1998). Durch die Bindung eines Inhibitorproteins an ein NF- κ B Dimer werden die NLS maskiert. NF- κ B verbleibt im Zytoplasma (Henkel et al. 1992; Tran et al. 1997).

NF- κ B kann über zahlreiche Stimuli aktiviert werden. Potente Induktoren sind proinflammatorische Zytokine, bakterielle und virale Produkte, proapoptotische sowie nekrotische Stimuli, wie zum Beispiel freie Sauerstoffradikale, Stress im endoplasmatischen Retikulum, ultraviolettes Licht und γ -Strahlung (Barnes 1997; Pahl 1999; Christen et al. 2013) (siehe Abbildung 1). Die Zellstimulation resultiert in der Phosphorylierung/Aktivierung eines Proteinkomplexes, der spezifischen I κ B-Kinase (IKK). Der Komplex besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α (IKK1) und/oder IKK β (IKK2), sowie einer regulatorischen Untereinheit, IKK γ , welche auch als *NF- κ B essential modulator* (NEMO) bezeichnet wird (Mercurio et al. 1997; Zandi et al. 1997; Rothwarf et al. 1998; Karin und Ben-Neriah 2000; Gilmore 2006). IKK1 und IKK2 bestehen jeweils aus einer N-terminalen Kinasedomäne, sowie zwei Proteininteraktionsdomänen: Der C-terminalen *helix-loop-helix* (HLH) Domäne und der *leucine zipper* Domäne (Sun und Andersson 2002; Hayden und Ghosh 2004). Die aktivierte IKK phosphoryliert zwei spezifische Serinreste von I κ B α (S32/S36) und I κ B β (S19/S23) (Zandi et al. 1997; Sun und Andersson 2002). Phosphoryliertes I κ B wird ubiquitiniert und 26S proteasomal degradiert. Das *nuclear localization signal* (NLS) von NF- κ B wird somit exponiert. NF- κ B transloziert in den Zellkern (Sun und Andersson 2002). Bei NF- κ B1 und NF- κ B2 wird hingegen die *I κ B-like* Domäne phosphoryliert. Nach der Polyubiquitinierung werden die Proteine in ihre aktiven Formen umgebaut, die ebenfalls in den Kern translozieren (Zheng et al. 2010). Im Falle der Zytokin-induzierten NF- κ B Aktivierung ist auch eine direkte Phosphorylierung von p65 am

Serinrest 536 durch die IKK, mit anschließender gesteigerter transkriptioneller Aktivität von p65, beschrieben (Sakurai et al. 1999; Yang et al. 2003).

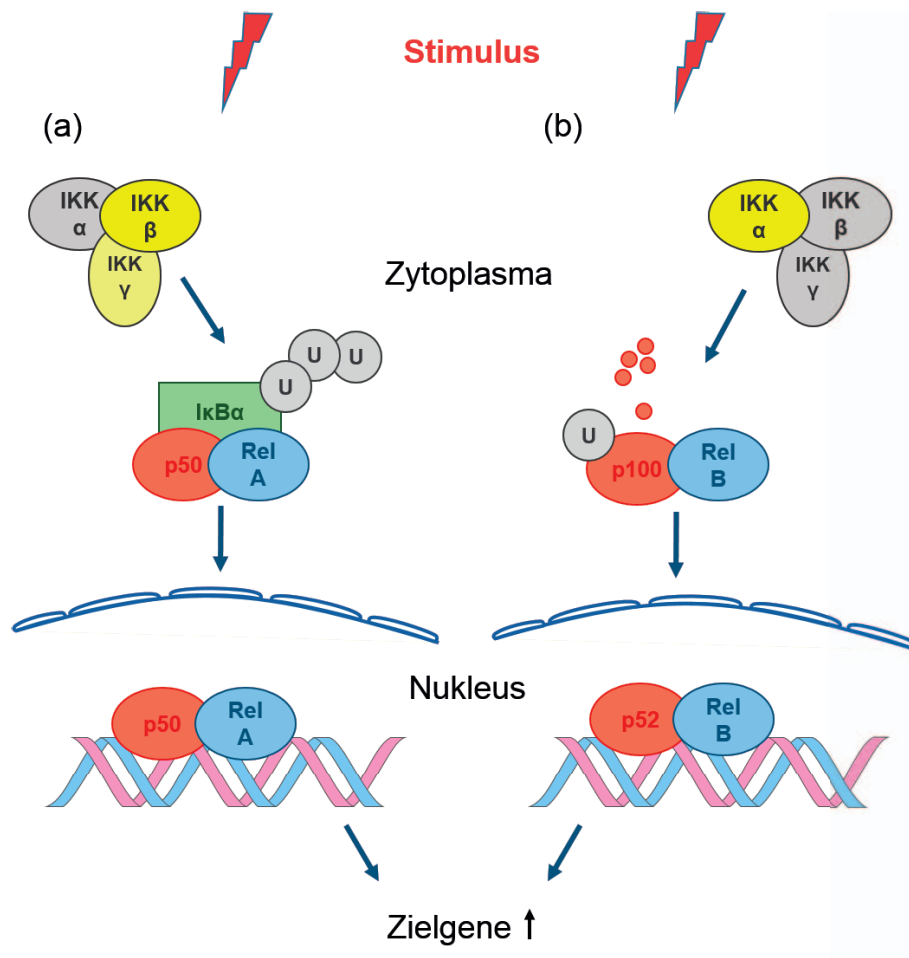


Abbildung 1: Klassischer (a) und alternativer (b) NF-κB Signalweg

Im nicht gestressten Zustand ist NF-κB an das Inhibitorprotein gebunden (a) oder liegt als inaktive Vorstufe vor (b). Stimuli aktivieren einen spezifischen Proteinkomplex, die IκB-Kinase (IKK). Beim klassischen Signalweg (a) phosphoryliert IKKβ IKKγ-abhängig IκBα. Das freigesetzte p50 / Rel A Dimer transloziert in den Zellkern und induziert die Transkription seiner Zielgene. Beim alternativen NF-κB Signalweg (b) bewirkt die Phosphorylierung der inhibitorischen Region von p100 durch die IKKα-Untereinheit der IKK die Aktivierung des NF-κB Dimers, welcher anschließend ebenfalls in den Nukleus wandert. IKK = IκB-Kinase; Abbildung modifiziert nach Bonizzi und Karin (2004).

Aufgrund der vielen verschiedenen Proteininteraktionsmöglichkeiten existieren mehrere NF-κB-Signalwege. Gängig ist die Einteilung in den klassischen und alternativen Weg. Der klassische Weg wird IKKγ-abhängig von IKKβ reguliert. Diese phosphoryliert IκBs und führt zur Freisetzung von NF-κB Dimeren, meist bestehend aus p50 und RelA (Ghosh und Karin 2002). Der alternative Signalweg benötigt für seine Aktivierung IKKα, jedoch nicht IKKβ und IKKγ. Durch die Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation der inhibitorischen Region von p100 kann das p52/RelB Dimer in den Kern wandern (Senftleben et al. 2001; Xiao et al. 2001; Dejardin

et al. 2002). Die Signalwege unterscheiden sich in ihren auslösenden Stimuli. Der klassische Signalweg wird durch Stress, bakterielle oder virale Infektionen und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 eingeleitet (Ghosh et al. 1998). Der alternative Weg kann zwar durch Proteine der TNF-Familie aktiviert werden, nicht jedoch durch TNF- α (Bonizzi et al. 2004; Bonizzi und Karin 2004).

Im Kern binden die NF- κ B Dimere an sogenannte *κ B-sites* in der Promotorregion ihrer Zielgene. Die Konsensussequenz der *κ B-sites* lautet 5'-GGGRNNYYCC-3' (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase, N = willkürliche Base) (Karin und Ben-Neriah 2000; Baltimore 2011). Laut Sun und Andersson (2002) muss NF- κ B zusätzlich an seinen Co-Aktivator CBP (*CREB-Binding Protein*; *CREB* = *cAMP response element-binding protein*) binden, um die optimale transkriptionelle Aktivität zu erlangen. NF- κ B fördert so die Expressionssteigerung von über 500 Genen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Akute Phase Proteine, Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Chemokine, Immunorezeptoren und viele mehr (Pahl 1999; Faustman und Davis 2010).

Die Signalwege von NF- κ B werden vielfältig reguliert. Neben der Sequestrierung von NF- κ B im Zytoplasma durch I κ Bs greifen noch eine Reihe anderer Mechanismen in die NF- κ B Aktivität ein. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α sind Induktoren und Zielgene zugleich. Sie bilden einen positiven Regelkreis (Bonizzi und Karin 2004). NF- κ B reguliert seine eigene Aktivität negativ. Dies geschieht durch Bindung an *κ B-sites* in der Promoterregion von I κ B α (Sun und Andersson 2002). Des Weiteren führen nicht alle NF- κ B Dimere zu einer Expressionssteigerung der Gene. P50 Homodimere bewirken das genaue Gegenteil. Sie hemmen die Genexpression durch Blockade der *κ B-sites* (Bohuslav et al. 1998; Zhong et al. 2002). Die Lokalisation der I κ Bs ist nicht auf das Zytoplasma beschränkt. I κ B α kann auch im Kern mit p50/p65 NF- κ B Heterodimeren interagieren und diese so hemmen (Tran et al. 1997). Bcl-3 veranlasst eine Expressionssteigerung durch Bindung von p50 Homodimeren im Kern (Lenardo und Siebenlist 1994).

2.2.2 Keap1-Nrf2-Signalweg

Der *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) ist ein redoxsensitiver Transkriptionsfaktor, der die Expressionssteigerung von antioxidativen, fremdstoffmetabolisierenden und anderen zytoprotektiven Genen bewirkt (Baird und Dinkova-Kostova 2011).

Nrf2 gehört wie auch NF-E2, Nrf1, Nrf3, Bach1 und Bach2 zur *Cap'n'Collar-* (CNC-) Familie, einer Subfamilie der *basic leucine zipper*-Transkriptionsfaktoren (Motohashi et al. 2002). Nrf2 weist sechs hochkonservierte Domänen auf: Neh1 – Neh6 (Nrf2-ECH *homology*) (siehe Abbildung 2), welche unterschiedliche funktionelle Aufgaben wahrnehmen (Itoh et al. 1999). Bei Neh1 handelt es sich um die typische *basic leucine Zipper*-Domäne. Sie ist verantwortlich für die Heterodimerisierung und anschließende Bindung an ARE, dem *antioxidant response element*. Neh2 ist am N-Terminus lokalisiert und fungiert aufgrund seiner Bindung an das Repressorprotein Keap1 als redoxabhängiger Regulator der Proteinstabilität. Auch erfolgt über Neh2 die Konjugation mit Ubiquitin. Neh2 besteht aus zwei Subsequenzen, ETGE und DLG, mit hoher bzw. niedriger Affinität zum Repressorprotein (Zhang 2006; Tkachev et al. 2011; Ma 2013). C-terminal befindet sich die Neh3 Domäne, die, wie auch Neh4 und Neh5, durch Bindung an Co-Aktivatoren die transkriptionelle Aktivität fördert (Katoh et al. 2001; Nioi et al. 2005). Neh6 ist für die Keap1 unabhängige Regulation der Proteinstabilität zuständig (McMahon et al. 2004). Des Weiteren beschreibt Jain (2005) ein zweiteiliges *nuclear localization signal* (NLS) und ein *nuclear export signal* (NES), welche C-terminal lokalisiert sind und den Kernimport und –export von Nrf2 kontrollieren .

Nrf2 wird im Zytosol durch das Inhibitorprotein Keap1, *Kelch-like ECH-Associated Protein 1*, posttranslational reguliert. Wie auch bei Nrf2 kann das Grundgerüst von Keap1 in verschiedene Domänen eingeteilt werden (siehe Abbildung 2). Neben der N-terminalen Region (NTR) befindet sich die BTB Domäne (*bric-à-brac, tramtrack, broad complex*). Diese vermittelt die Homodimerisierung von Keap1 und die Bindung von Keap1 an Cullin (Cul) 3, einem Gerüstprotein der Ubiquitinligase E3 (Cullinan et al. 2004; Tkachev et al. 2011). Die Bindung von Keap1 an die Neh2 Domäne von Nrf2 vermittelt hingegen die DGR bzw. Kelch Domäne (*double glycine repeats - Kelch repeats*). Strukturell bildet diese Domäne einen Sechsstab- β -Propeller und bewirkt zusätzlich die Verankerung im Aktin-Zytoskelett (Kang et al. 2004; Padmanabhan et al. 2006). Zwischen den beiden Domänen BTB und DGR befindet sich die cysteinreiche *intervening region* (IVR) oder *linker region* (LR), welche ebenfalls zur Bindung an Cullin 3 beiträgt (Dinkova-Kostova et al. 2002; Canning et al. 2013). Analog zur NTR weist Keap1 auch eine C-terminale Region (CTR) auf.

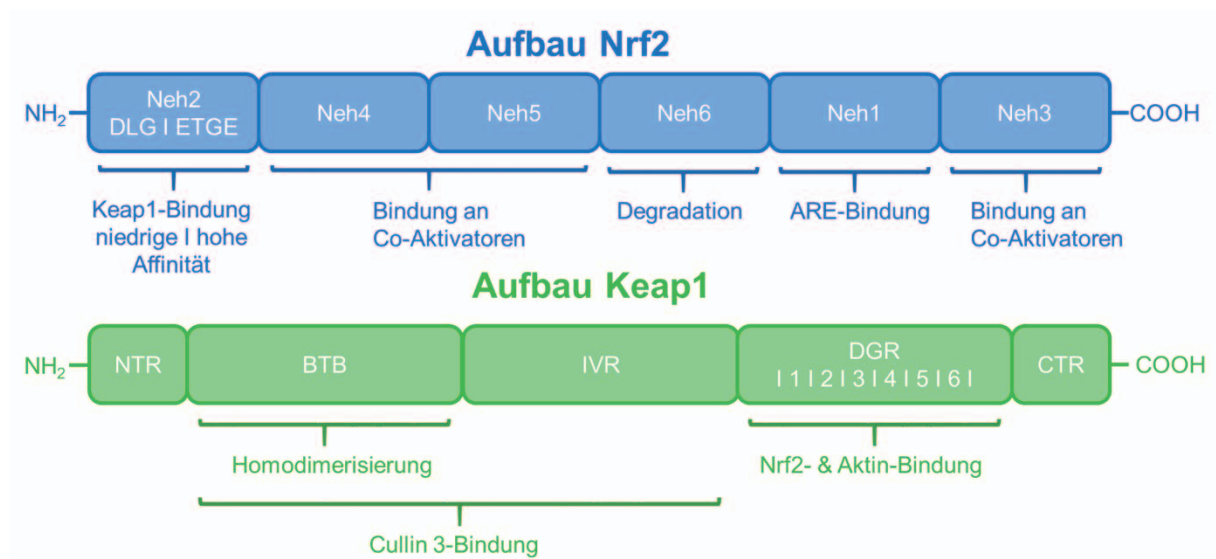


Abbildung 2: Aufbau der Proteine Nrf2 und Keap1

ARE = *antioxidant response element*; BTB = *bric-à-brac, tramtrack, broad complex*; CTR = C-terminale Region; DGR = *double glycine repeats*; IVR = *intervening region*; Neh = *Nrf2-ECH homology*; Nrf2 = *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*; Keap1 = *kelch-like ECH-associated protein 1*; Abbildung modifiziert nach Stefanson und Bakovic (2014).

Unter basalen Bedingungen ist Nrf2 über seine Neh2 Domäne an ein Keap1 Homodimer gebunden. Keap1 fungiert als Adapter zum Cullin (Cul) 3 der E3-Ligase. Diese katalysiert die Polyubiquitinierung der Neh2 Domäne und vermittelt so die 26S proteasome Degradation von Nrf2 (McMahon et al. 2003; Kobayashi et al. 2004).

Xenobiotischer und oxidativer Stress stört die Zellhomöostase und führt zu einer Aktivierung des Keap1-Nrf2-Signalweges (Motohashi und Yamamoto 2004) (siehe Abbildung 3). Induktoren wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Stickstoffspezies (RNS), Elektrophile und Xenobiotika sind in der Lage die Sulfhydrylgruppen der Cysteine des Keap1 zu modifizieren, sodass es zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommt. Der Keap1-Nrf2-Komplex dissoziiert daraufhin (Dinkova-Kostova et al. 2002; Wakabayashi et al. 2004; Yamamoto et al. 2008; Kensler und Wakabayashi 2010; Tkachev et al. 2011). Obwohl Keap1 als Hauptregulator der Nrf2 Aktivität bekannt ist, sind weitere Mechanismen erforscht, welche in die Nrf2 Stabilität eingreifen und somit auch in die Regulation der Signalkaskade. Wichtig zu nennen ist hier die Nrf2-Phosphorylierung durch Proteinkinasen (Baird und Dinkova-Kostova 2011), wie zum Beispiel der Proteinkinase C (PKC) (Huang et al. 2000, 2002), den *mitogen-activated protein* Kinasen (MAPK) (Zipper und Mulcahy 2000) oder der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Kang et al. 2002; Kang et al. 2003). Laut Tkachev et al. (2011) ist für die volle Aktivierung des Nrf2/Keap1/ARE Signalweges sowohl die

Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors als auch die Modifizierung der Keap1-Cysteine notwendig.

Steigt die Konzentration an freiem Nrf2 im Zytoplasma an, so transloziert Nrf2 in den Zellkern. Dieser Konzentrationsanstieg beruht laut verschiedenen Studien entweder auf der Freisetzung von Nrf2 aus seinem Komplex mit Keap1 (Baird und Dinkova-Kostova 2011) oder darauf, dass „tote“ Keap1-Komplexe entstehen: Die Nrf2-DLG-Bindung zerbricht bei Bestehenbleiben der ETGE-Bindung. Gebundenes Nrf2 kann so nicht mehr ubiquitiniert werden. Neusynthetisiertes Nrf2 häuft sich im Cytoplasma an (Zhang 2006; Ma 2013). Im Kern bindet Nrf2 als Heterodimer an das *antioxidative responsive element* (ARE), auch als *electrophile response element* (EpRE) bezeichnet, einer spezifischen Aminosäuresequenz (5'-TGACNNNGC-3'; N = willkürliche Base) in der Promotorregion der Zielgene und bewirkt so deren Expressionssteigerung (Lee und Johnson 2004; Baird und Dinkova-Kostova 2011). Die ARE vermittelte Transkriptionssteigerung erfordert die Heterodimerisierung mit anderen bZIP Proteinen, wie den *small musculoaponeurotic fibrosarcoma* (Maf) Proteinen (MafF, MafG, MafK) (Itoh et al. 1997; Wild et al. 1999; Lee und Johnson 2004; Ma 2013), den Jun-Proteinen (c-Jun, Jun-B, Jun-D) (Venugopal und Jaiswal 1998; Wild et al. 1999) oder dem *activating transcription factor 4* (ATF4) (He et al. 2001; Lee und Johnson 2004). Nrf2 initiiert so die Transkription detoxifizierender Phase II Enzyme und antioxidativer Proteine (Kwak et al. 2002; Rahman et al. 2006). Eine Potenzierung der Transaktivierungsaktivität kann durch die Interaktion mit dem Co-Aktivatoren CBP erzielt werden. Die CBP-Bindung erfolgt über die Domänen Neh4 und Neh5 (Katoh et al. 2001).

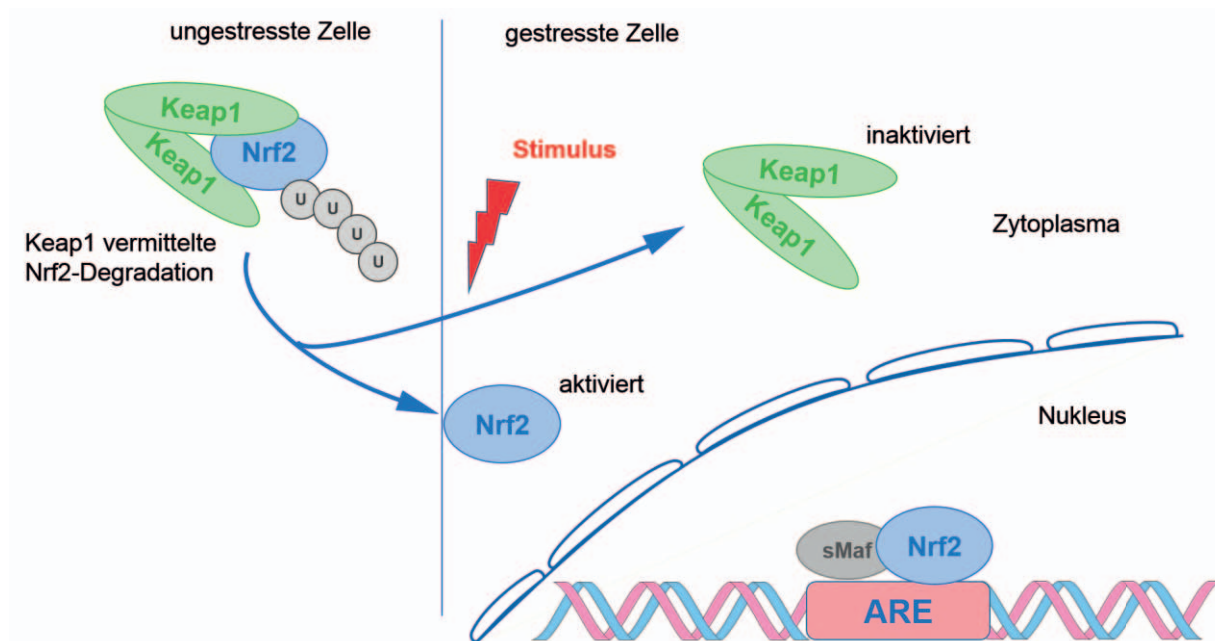


Abbildung 3: Der Keap1/Nrf2 Signalweg

In der ungestressten Zelle wird Nrf2 mithilfe des Keap1 konstant ubiquitiniert und proteasomal degradiert. Durch Stimuli wie Elektrophile oder oxidativer Stress wird Keap1 inaktiviert. Der stabilisierte Nrf2 akkumuliert im Nukleus und aktiviert zahlreiche zytoprotektive Gene. ARE = *antioxidant response element*; Nrf2 = *nuclear factor erythroid-2-related factor 2*; Keap1 = *kelch-like ECH-associated protein 1*; sMaf = *small musculoaponeurotic fibrosarcoma*; U = Ubiquitin; Abbildung modifiziert nach Mitsuishi et al. (2012).

2.2.3 *Unfolded Protein Response* infolge von Stress im endoplasmatischen Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum, kurz ER, ist ein tubuläres Zellorganell, das an vielen metabolischen Prozessen beteiligt ist. Es dient als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher, der Lipidsynthese, sowie der posttranslationalen Modifikation und Faltung von Membranproteinen und sekretorischen Proteinen (Kaufman 1999; Schröder und Kaufman 2005b; Hetz 2012). ER-Stress entsteht durch eine Imbalance zwischen dem Aufkommen un- oder fehlgefalteter Proteine und der Faltungskapazität des ER. Darauf reagiert das ER mit der sogenannten *unfolded protein response* (UPR). Ziel ist es, das Proteinaufkommen zu reduzieren und die Faltungskapazität zu erhöhen. Dafür werden drei Mechanismen eingesetzt: (I) Reduktion der Proteintranslation (Koumenis et al. 2002), (II) gesteigerte Translation von ER-Chaperonen wie dem *immunoglobulin heavy-chain binding protein* (BiP) (Schröder und Kaufman 2005a), und (III) ER assoziierte Degradation (*ER-associated degradation*, ERAD), welche fehlgefaltete Proteine des ER im Cytosol 26S proteasomal degradiert (Ahner und Brodsky 2004). Kann die Homöostase nicht wieder hergestellt werden, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet (Ron und Walter 2007). ER-Stress ist assoziiert mit physiologischen als

auch pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen, Medikamenten (Calfon et al. 2002b), Störungen der endogenen ROS Produktion (Federoff 2006) und viralen Infektionen (Zhang und Wang 2012).

Die UPR wird über drei Transmembranproteine vermittelt: PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*), IRE1 α und - β (*inositol-requiring transmembrane kinase/endonucleases*) und ATF6 α und - β (*activating transcription factor 6*) (Schröder und Kaufman 2005b; Ron und Walter 2007; Walter und Ron 2011). Diese nutzen einen einheitlichen Mechanismus der Signaltransduktion (Walter und Ron 2011), welche in Abbildung 4 veranschaulicht ist. Im ungestressten Zustand sind IRE1, PERK und ATF6 an das Chaperon BiP gebunden. BiP ist auch bekannt als *heat shock protein 5* (HSPA5) oder *glucose regulated protein 78* (GRP78) und gehört der HSP (*heat shock protein*) 70 Familie an. Bei ER-Stress bindet BiP an luminale un- oder fehlgefaltete Proteine. Die Transmembranproteine werden durch das Ablösen von BiP aktiviert. Aufgrund seiner zentralen Rolle in der Aktivierung wird BiP als Masterregulator der UPR bezeichnet (Bertolotti et al. 2000; Bogaert et al. 2011; Cnop et al. 2012). Nachfolgend sind die drei Signalwege der UPR näher erläutert.

Bei PERK handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein mit luminaler Domäne zur Stressdetektion und zytosolischer Kinasedomäne (Ron und Walter 2007; Dufey et al. 2014). Das Ablösen von BiP führt zur Oligomerisierung von PERK mit anschließender Aktivierung der Kinasedomäne durch trans-Autophosphorylierung (Ron und Walter 2007). Substrat der aktivierten Kinasedomäne ist die α -Untereinheit des *eukaryotic translation initiation factor-2* (eIF2 α), welche an Ser51 phosphoryliert wird (Harding et al. 1999; Ron und Walter 2007). Die Ausbildung des 43S Translationsinitiationskomplexes wird inhibiert. Durch die Reduktion der globalen Proteinsynthese wird das Aufkommen ungefalteter Proteine gesenkt. (Hinnebusch 1994; Harding et al. 1999; Harding et al. 2000). Gleichzeitig kommt es durch die Inaktivierung von eIF2 α zu einer selektiven Translationssteigerung von ATF4 mRNA, die kurze, offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) in ihrem 5' UTR-Bereich (*untranslated region*) enthält (Ma 2003; Ma und Hendershot 2003; Dufey et al. 2014). ATF4 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Reihe von UPR Zielgenen positiv reguliert. Es kommt zur Transkriptionssteigerung von Apoptosegenen wie CHOP (*C/EBP-homologous protein*) auch bekannt als DDIT3 (*DNA-damage-inducible transcript 3*) oder GADD153 (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 153*) (Harding et al. 2000; Oyadomari und Mori 2004), ER-residenten Faltungsenzymen wie PDIA4 (*protein*

disulfide isomerase family A, member 4) (Thomas et al. 2010), Genen zur Regulation des Aminosäurestoffwechsels, der antioxidativen Reaktion und des Gens GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible gene 34*) (Dufey et al. 2014). GADD34 bzw. PPP1R15A (*protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A*) reguliert PERK durch die Dephosphorylierung von eIF2 α negativ (Ma und Hendershot 2003). Daneben existiert ein weiterer negativer Feedback Mechanismus, der eIF2 α dephosphoryliert und auf der konstitutiven Expression von CReP (*constitutive repressor of eIF2 α phosphorylation*), auch bekannt als PPP1R15B (*protein phosphatase 1, regulatory subunit 15B*), basiert (Jousse et al. 2003).

Eine weitere Achse der UPR wird über IRE1 vermittelt. Dieser Signalweg wurde als erstes bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Cox et al. 1993; Mori et al. 1993). Beim Säuger existieren zwei homologe Formen: IRE1 α und IRE1 β . IRE1 α wird in allen Zellen exprimiert. Das Vorkommen von IRE1 β ist auf die Epithelzellen des Darms beschränkt (Lee et al. 2002). Nachfolgend wird IRE1 als Oberbegriff sowohl für die Hefe als auch für Säuger verwendet. Wie PERK ist IRE1 ein Typ I Transmembranprotein, bestehend aus luminaler Domäne und einem zytoplasmatischen Anteil mit einer Proteinkinase und einer Endoribonuklease (RNase) (Cox et al. 1993; Mori et al. 1993; Calton et al. 2002; Liu et al. 2002). Bei ER-Stress oligomerisiert IRE1, sodass die trans-Autophosphorylierung der Kinasedomäne möglich ist. Einziges Substrat der Kinasedomäne ist IRE1 selbst (Ron und Walter 2007). Die Effektorfunktion von IRE1 wird über die RNase Domäne vermittelt. Substrat der RNase ist die mRNA des Transkriptionsfaktors Hac1 (*homologous to ATF/CREB1*) der Hefe (Cox und Walter 1996) bzw. XBP1 (*X-box binding protein 1*) der Metazoen (Yoshida et al. 2001). Das Spleißen der prä-mRNA erfolgt an zwei Stellen. Durch die Exzision eines Introns, das bei XBP1 aus 26 und bei HAC1 aus 252 Nukleotiden besteht, kommt es zur Leserasterverschiebung. Die gespleißte mRNA encodiert einen potenten Transkriptionsfaktor. Die Transkriptionsfaktoren werden als HAC1i (*induced*) bzw. XBP1s (*spliced*) bezeichnet (Patil und Walter 2001; Yoshida et al. 2001; Calton et al. 2002; Lee et al. 2002; Ron und Walter 2007). HAC1i bzw. XBP1s translozieren in den Kern, wo sie an das *unfolded protein response element* (UPRE) (HAC1i) bzw. *ER stress response element* (ERSE) (XBP1s) in der Promotorregion ihrer Zielgene binden (Cox und Walter 1996; Yamamoto et al. 2004). Zu den Zielgenen gehören ER-Chaperone, Glykosylierungsenzyme, sowie Komponenten des ERAD und der

Phospholipidsynthese (Dufey et al. 2014). Außerdem sind HAC1 und XBP1 selbst transkriptionelle Ziele der UPR (Ron und Walter 2007). Allerdings fungiert ungespleißte mRNA als XBP1 Inhibitor. Die UPR wird durch Heterodimerisierung mit bereits gespleißtem XBP1 terminiert. Des Weiteren besteht eine Konkurrenz um die XBP1 Bindungsstellen (Yoshida et al. 2006).

ATF6 ist ein metazoenspezifisches Typ II Glykoprotein mit einer Transmembrandomäne (Haze et al. 1999; Haze et al. 2001; Adachi et al. 2008). Beim Säuger existieren zwei homologe Proteine: ATF6 α und ATF6 β /*cAMP-response-element-binding protein (CREB)-related protein (CREB-RP)/G13* (Schröder und Kaufman 2005b). ATF6 wird als inaktive Vorstufe (p90ATF6) synthetisiert (Haze et al. 1999). Die ER-Stressdetektion basiert auf zwei *Golgi localisation sequences* (GLSs) in der ATF6 ER luminalen Domäne, die durch BiP maskiert werden. ATF6 retiniert im ER. Ungefaltete Proteine sequestrieren BiP von den GLSs. ATF6 transloziert zum Golgi-Apparat (Shen et al. 2002). Dort erfolgt die Aktivierung durch *site-1* und *site-2* Proteasen, welche das zytosolische bZIP-Fragment, ATF6f (*fragment*) (p50ATF6), freisetzen. ATF6f transloziert in den Kern, um dort die Expression seiner Zielgene zu veranlassen (Haze et al. 1999; Wang et al. 2000; Ye et al. 2000). Dafür bindet ATF6f an das *ATF/cAMP response element* (CRE) oder an das *ER stress response element* (ERSE) (Yoshida et al. 1998; Wang et al. 2000; Yoshida et al. 2000). Für die Bindung an ERSE wird der *nuclear factor Y* (NF-Y)/*CCAAT-binding factor* (CBF) benötigt (Kokame et al. 2001). Zu den Zielgenen zählen Komponenten des ERAD, der Proteinfaltungsmaschinerie, wie zum Beispiel die Chaperone BiP, HSP90B1 (*heat shock protein 90kDa beta member 1, glucose-regulated protein 94* (GRP94)) und Calnexin (Ye et al. 2000; Adachi et al. 2008) und proapoptotische Gene wie DDIT3 (Szegezdi et al. 2006). Aber auch XBP1 wird durch ATF6f beeinflusst. Zum einen wird die Transkription von XBP1 mRNA durch ATF6f induziert. Des Weiteren sind ATF6f und XBP1s zur Ausbildung von Heterodimeren fähig, die gemeinsam die Transkriptionssteigerung von Zielgenen bewirken (Yoshida et al. 2001; Shoulders et al. 2013).

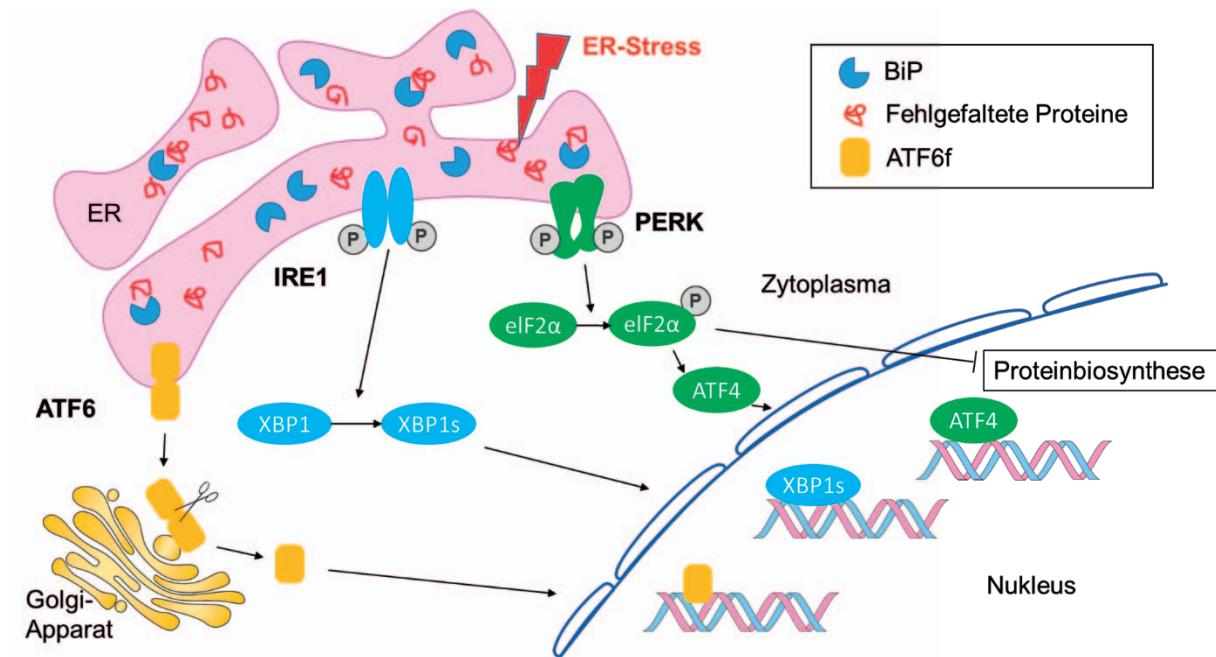


Abbildung 4: Signalwege der UPR beim Säugetier

Die *unfolded protein response* (UPR) wird über drei Transmembranproteine vermittelt: ATF6, IRE1 und PERK. In der ungestressten Zelle sind diese an das Chaperon BiP gebunden. Bei ER-Stress bindet BiP an luminale un- oder fehlgefaltete Proteine. ATF6, IRE1 und PERK werden durch das Ablösen von BiP aktiviert. Anschließend transloziert ATF6 in den Golgi-Apparat. *Site-1* und *site-2* Proteasen setzen das zytosolische bZIP-Fragment, ATF6f, frei. Im Kern bindet ATF6f an seine Zielsequenzen. Bei IRE1 spleißt die Endonuklease-Domäne die prä-mRNA von XBP1 an zwei Stellen. Die gespleißte mRNA kodiert den potenten Transkriptionsfaktor XBP1s. Substrat der aktivierten PERK-Kinasedomäne ist die α -Untereinheit des eIF2. Dadurch wird mit Ausnahme des ATF4 die Proteinbiosynthese gehemmt. ATF4 wird in seiner Transkription gesteigert und reguliert Zielgene der UPR positiv. ATF4 = *activating transcription factor 4*; ATF6 = *activating transcription factor 6*; ATF6f = ATF6fragment; BiP = *immunoglobulin heavy chain binding protein*; ER = Endoplasmatisches Retikulum; eIF2 α = *eukaryotic translation initiation factor-2 α* ; IRE1 = *inositol-requiring transmembrane kinase/endonucleases*; PERK = *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*; XBP1 = *X-box binding protein 1*; XBP1s = XBP1spliced; Abbildung modifiziert nach Zhang und Kaufman (2008) und Gessner et al. (2014).

Kann das Gleichgewicht im ER nicht wiederhergestellt werden, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Es werden ein intrinsischer und ein extrinsischer Signalweg der Apoptose unterschieden. Der intrinsische Signalweg ist rezeptorunabhängig; der extrinsische rezeptorabhängig (Schröder und Kaufman 2005b).

Der intrinsische, mitochondriale Signalweg wird über Proteine der *B-cell lymphoma 2* (BCL2) Familie kontrolliert. Die Mitglieder dieser Familie können sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Eigenschaften aufweisen. Proapoptotische Mitglieder sind die *BH3 only* Proteine (*BCL-2 Homology*) Bak (*BCL2-antagonist/killer*) und Bax (*BCL2-associated X protein*) (Schröder und Kaufman 2005b; Lomonosova und Chinnadurai 2008). Antiapoptotische Mitglieder hemmen Bak und Bax (Tait und Green 2010). Bei Aufhebung dieser Inhibition oligomerisieren Bak und Bax. Dies führt zum Ausstrom von Ca^{2+} aus dem ER (Scorrano et al. 2003). Die innere Mitochondrienmembran depolarisiert. Cytochrom C wird freigesetzt und ermöglicht die

Komplexbildung von Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und Procaspase-9, was die Aktivierung der Caspasenkaskade nach sich zieht und in der Aktivierung der Caspase 3 mündet (Crompton 1999; Rutkowski und Kaufman 2004). ATF4 und ATF6f beeinflussen den intrinsischen Apoptoseweg durch die Expressionssteigerung des proapoptotischen bZIP-Transkriptionsfaktors DDIT3. DDIT3 inhibiert den Promotor antiapoptotischer BCL2 Proteine. Das Gleichgewicht wird zugunsten der proapoptotischen Mitglieder verschoben (McCullough et al. 2001; Schröder und Kaufman 2005b).

Der extrinsische Signalweg kann mithilfe von IRE1 aktiviert werden. Dafür rekrutiert IRE1 das Adaptermolekül *TNF-receptor-associated factor 2* (TRAF2). Der IRE1-TRAF2-Komplex ist wiederum in der Lage, die *apoptosis-signal-regulating kinase* (ASK1), eine *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAPKKK), zu aktivieren. Dies führt zur Aktivierung von *c-Jun N-terminale Kinasen* (JNK) (Nishitoh et al. 2002; Liu und Kaufman 2003). Durch Phosphorylierung antiapoptotischer BCL2 Mitglieder ist JNK in der Lage diese zu inhibieren (Szegezdi et al. 2006).

2.2.4 Interaktion der stressresponsiven Signalwege

Das erhöhte Aufkommen von ROS führt zu oxidativem Stress. Dadurch werden redoxsensitive Transkriptionsfaktoren aktiviert. Eine geringe Belastung induziert die Aktivierung von Nrf2. Die Folge ist die Transaktivierung von Genen, die antioxidative Enzyme enkodieren. Ein mittleres ROS-Aufkommen fördert das Inflammationsgeschehen über die Aktivierung der NF- κ B Transkriptionsfaktorenfamilie. Starker oxidativer Stress resultiert im Zelluntergang via Apoptose/Nekrose, da die mitochondrialen PT (*Permeability Transition*)-Poren geöffnet werden und der Elektronentransfer zusammenbricht (Gloire et al. 2006). Im Folgenden ist beschrieben, welche Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Transkriptionsfaktoren bestehen.

2.2.4.1 Interaktion zwischen Nrf2 und NF- κ B

Die beiden Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Nrf2 werden auch als Gegenspieler bezeichnet (Gessner et al. 2013). Beide können durch ROS aktiviert werden. Nrf2 wirkt

zytoprotektiv und unterdrückt die Entzündungsreaktion. NF- κ B hingegen fördert diese (Chen et al. 2006; Rahman et al. 2006). NF- κ B und Nrf2 beeinflussen sich in ihren Signalwegen gegenseitig. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig erforscht.

NF- κ B kann Nrf2 auf der Transkriptionsebene direkt inhibieren (Liu et al. 2008; Buelna-Chontal und Zazueta 2013). In NF- κ B und Nrf2 simultan aktivierten Zellen antagonisiert p65 die transkriptionelle Aktivität von Nrf2 unidirektional. In p65 überexprimierten Zellen wird die ARE abhängige *heme oxygenase-1* (HO-1) Expression stark unterdrückt. Die Transkriptionsinhibition ARE gesteuerter Gene erfolgt unabhängig von der p65 Transkriptionsaktivität. Dies ist auf zwei Mechanismen zurückzuführen. Zum einen konkurriert p65 mit Nrf2 um das *CREB binding protein* (CBP), einen Co-Aktivator. Zum anderen rekrutiert p65 den Co-Repressor HDAC3 (*histone deacetylase 3*) und erleichtert dessen Interaktion mit CBP oder MafK. Durch die lokale Histonyhypomethylierung wird die Nrf2/ARE vermittelte Genexpression gehemmt (Liu et al. 2008).

Neben der negativen Regulation von Nrf2 durch NF- κ B ist auch die entgegengesetzte Inhibition beschrieben. Der zytoprotektive Effekt von Nrf2 wird nicht nur über die Aktivierung der antioxidativen Maschinerie erzielt, sondern auch über eine Hemmung NF- κ B vermittelter proinflammatorischer Signalwege (Li et al. 2008). Koh et al. (2011) zeigten eine Unterdrückung der NF- κ B Aktivierung in LPS behandelten Mikrogliazellen. Natürliche Nrf2 Aktivatoren wie Phenylethylisothiocyanat (PEITC), Sulforaphan (SUL) und Curcumin (CUR) sind *in vitro* in der Lage eine induzierte NF- κ B Aktivierung abzuschwächen (Jeong et al. 2004; Song et al. 2009). Darüber hinaus können PEITC und SUL im Zellversuch die Phosphorylierung von IKK und I κ B α hemmen. Die Translokation von p65 in den Zellkern wird dadurch vermindert (Xu et al. 2005). Zimtaldehyd, ein spezifisches Diterpen von *Cinnamomum cassia Presl*, bewirkt seine antiinflammatorischen Effekte in TNF α behandelten Endothelzellen in Abhängigkeit von der Behandlungszeit auf verschiedene Art und Weise. Bei einer kurzen Behandlungszeit verhindert Zimtaldehyd die Degradation des Inhibitorproteins I κ B α . Wird die Behandlungszeit verlängert, so wird die Expression von Nrf2 Zielgenen wie der HO-1 eingeleitet (Liao et al. 2008). Keap1 ist normalerweise als Nrf2 Inhibitorprotein bekannt (siehe 2.2.2). Lee et al. (2009) beschreiben darüber hinaus das Herunterregulieren des NF- κ B Signalweges durch Keap1 über die Interaktion mit

IKK β . Keap1 fungiert als Adapterprotein zum E3-Ubiquitinligase-Komplex, sodass IKK β degradiert wird. IKK β kann die Inhibition von NF- κ B nun nicht mehr aufheben.

Die Beeinflussung NF- κ Bs durch Nrf2 wurde auch im Tierversuch beobachtet. So zeigen Nrf2 defiziente Mäuse eine gesteigerte NF- κ B Aktivierung gegenüber dem Nrf2-Wildtyp (Rangasamy et al. 2005; Jin et al. 2008).

2.2.4.2 NF- κ B Aktivierung innerhalb der UPR

Stress im ER führt zur Aktivierung des inflammationsfördernden Transkriptionsfaktors NF- κ B (Pahl und Baeuerle 1995; Jiang et al. 2003; Deng et al. 2004). Alle drei Sensoren der UPR (PERK, IRE1 α und ATF6) können die NF- κ B Aktivität modulieren (Hotamisligil 2010; Chaudhari et al. 2014).

Unter ER Stress autophosphoryliert IRE1 α , was eine Konformationsänderung der zytosolischen Domäne bedingt. Dadurch kann IRE1 α an das Adapterprotein *tumor necrosis factor α (TNF α) receptor-associated factor 2* (TRAF2) binden. Der IRE1 α -TRAF2 Komplex rekrutiert die IKK. IKK veranlasst durch Phosphorylierung die I κ B Degradation. Das freigesetzte NF- κ B kann in den Kern translozieren und die Expression proinflammatorischer Gene bewirken. Diese Erkenntnisse erbrachten Kaneko et al. (2003) und Hu et al. (2006) *in vitro*.

Die PERK induzierte NF- κ B Aktivierung ist IKK unabhängig. Die Modulation erfolgt stattdessen über die Hemmung der globalen Proteintranslation. Diese bewirkt PERK durch Phosphorylierung der α -Untereinheit des *eukaryotic translation initiation factor-2* (eIF2 α) (siehe 2.2.3). I κ B α besitzt eine kürzere Halbwertszeit als NF κ B, sodass das Verhältnis von I κ B α zu NF- κ B zugunsten des letzteren verschoben wird. Die NF- κ B Inhibition wird dadurch abgeschwächt (Jiang et al. 2003; Deng et al. 2004; Wu et al. 2004; Tam et al. 2012). Tam et al. (2012) postulieren, dass für die optimale NF- κ B Aktivierung bei ER Stress der gemeinsame Einfluss von IRE1 und PERK notwendig ist.

Über die Rolle von ATF6 in der NF- κ B Aktivierung während ER Stress ist wenig bekannt. Yamazaki et al. (2009) beschreiben eine mit ATF6 in Zusammenhang stehende Aktivierung von NF- κ B via AKT Phosphorylierung im Anschluss an eine UPR Stimulation *in vitro* durch das Zytotoxin Subtilase (SubAB). SubAB ist ein AB5 Toxin,

das von einigen Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* produziert wird. Die Toxizität von SubAB besteht in der Spaltung des Chaperons BiP/GRP78 (Paton et al. 2006; Wolfson et al. 2008). Dadurch kommt es zur Aktivierung von PERK, IRE1 und ATF6 (Wolfson et al. 2008). Dies führt aber nur im Falle von ATF6 zur Phosphorylierung von AKT (Yamazaki et al. 2009). AKT, auch bezeichnet als Proteinkinase B (PKB), phosphoryliert die IKK α Untereinheit an T23. Der so aktivierte IKK Komplex phosphoryliert anschließend sowohl das Inhibitorprotein I κ B als auch die p65/RelA Untereinheit selbst. Die NF- κ B Aktivität ist gesteigert (Bai et al. 2009).

2.2.4.3 Rolle des Nrf2 in der UPR

In vitro führt die Deletion des Transkriptionsfaktors Nrf2 bei Exposition von ER Stress zu einer gesteigerten Apoptoserate (Cullinan et al. 2003). Damit in Zusammenhang steht die PERK abhängige Phosphorylierung von Nrf2, welche die Dissoziation des Nrf2/Keap1 Komplexes fördert. Nrf2 ist ein direktes Substrat von PERK. Die Phosphorylierung erfolgt eIF2 α unabhängig (Cullinan et al. 2003; Schröder und Kaufman 2005b; Cullinan und Diehl 2006). Cullinan et al. (2003) nehmen an, dass der Nrf2 abhängige Schutz vor dem UPR induzierten Zelltod von der Expressionsinduktion Phase II detoxifizierender Enzyme (Kwak et al. 2002; Rahman et al. 2006) resultiert.

Des Weiteren ist Nrf2 als indirektes Substrat der IRE1 α Kinase beschrieben (Digaleh et al. 2013). Mithilfe des Adapterproteins TRAF2 ist IRE1 α in der Lage, einen Komplex mit der *apoptosis signal regulating kinase 1* (ASK1) zu bilden (Nishitoh et al. 2002; Digaleh et al. 2013). Dieser aktiviert die *c-Jun amino-terminal kinase* (JNK) (Urano et al. 2000; Nishitoh et al. 2002; Digaleh et al. 2013). In der Studie von Jeon et al. (2011) führte die Aktivierung der JNK zur Phosphorylierung und Kerntranslokation des Nrf2. Im Nukleus wurde die ARE gelenkte HO-1 Expression induziert.

2.3 Verknüpfung zwischen stressresponsiven Signalwegen und dem Lipidstoffwechsel

2.3.1 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sind Transkriptionsfaktoren, die zur Superfamilie der Kernrezeptoren gehören (Desvergne und Wahli 1999; Kersten et

al. 2000; Evans et al. 2004; Ferré 2004). Es sind drei Isoformen bekannt: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ (Ferré 2004; Brown und Plutzky 2007; Abbott 2009; Rakhshandehroo et al. 2010; Contreras et al. 2013). Aufgebaut sind die PPARs aus einer N-terminalen Liganden unabhängigen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne (*DNA binding domain*, DBD) mit zwei Zinkfingern und einer C-terminalen Liganden abhängigen Aktivierungsdomäne (*ligand binding domain*, LBD) (Berger und Moller 2002; Ferré 2004).

PPAR α wurde im Jahr 1990 entdeckt. Er gilt als Masterregulator des hepatischen Lipidstoffwechsels (Isseman und Green 1990; Rakhshandehroo et al. 2010). Außer in der Leber, wird PPAR α in Herz, Niere und Skelettmuskel in hohem Maße exprimiert (Braissant et al. 1996; Su et al. 1998). Natürliche Liganden des PPAR α sind Fettsäuren und Eicosanoide (Gottlicher et al. 1992; Yu et al. 1995; Forman et al. 1997; Kliewer et al. 1997). Ungesättigte Fettsäuren besitzen gegenüber den gesättigten Fettsäuren eine höhere Affinität (Ferré 2004). Devchand et al. (1996) führen des Weiteren Leukotrien β_4 als natürlichen Liganden auf. Synthetische Liganden sind beispielsweise Fibrate (Willson et al. 2000; Berger und Moller 2002) und NSAIDs (*non-steroidal anti-inflammatory drugs*) (Lehmann et al. 1997). Bei Stress kommt es zur Freisetzung von Glukokortikoiden aus dem Nebennierenmark. In der Leber von Ratten konnten diese PPAR α aktivieren. Der Agonist Dexamethason war dazu ebenfalls in der Lage (Lemberger et al. 1996).

Nach Ligandenaktivierung kommt es zur obligaten Heterodimerisierung mit dem *9-cis-retinoic acid receptor* (RXR) (siehe Abbildung 5). Der PPAR α /RXR Komplex bindet anschließend an *peroxisome proliferator response elements* (PPREs) der DNA (Ferré 2004; Rakhshandehroo et al. 2010). PPREs bestehen aus zwei Wiederholungen des Hexamers AGGTCA, welche durch eine beliebige Base getrennt sind (Ijpenberg et al. 1997; Desvergne und Wahli 1999). PPAR α reguliert so Gene des Lipidstoffwechsels, die zum Beispiel für den Transport oder die Aufnahme der Lipide in die Zelle notwendig sind, der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation und der Ketogenese (Wahli et al. 1995; Contreras et al. 2013).

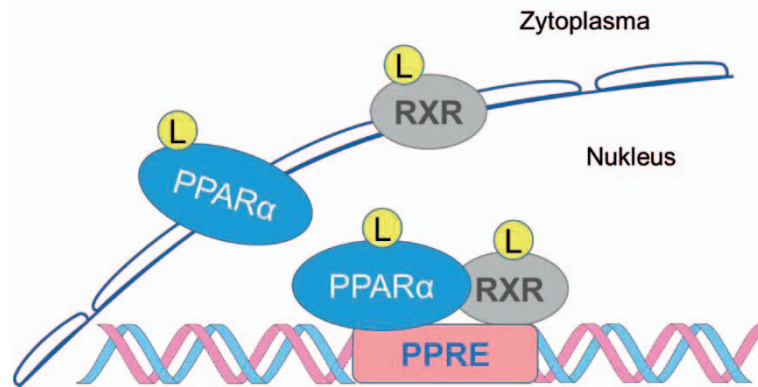


Abbildung 5: Mechanismus der Transkriptionsregulation durch PPAR α

Nach Ligandenaktivierung kommt es zur obligaten Heterodimerisierung mit RXR. Der PPAR α /RXR Komplex bindet an PPRES der DNA. L = Ligand; PPAR α = *peroxisome proliferator-activated receptor α* ; PPRE = *peroxisome proliferator response element*; RXR = *9-cis-retinoic acid receptor*; Abbildung modifiziert nach Kersten et al. (2000).

Bei Ratten und Mäusen können durch PPARs in der Leber toxische Effekte erzielt werden. Innerhalb weniger Tage kann es aufgrund einer starken peroxisomalen Proliferation zur Hepatomegalie und Hepatokarzinogenese kommen (Isseman und Green 1990; Dreyer et al. 1992; Bieri und Lhuguenot 1993). Bei Ratten und Mäusen handelt es sich um proliferierende Spezies. In nicht-proliferierenden Spezies wie Schweinen, Meerschweinchen, Affen und Menschen treten derartige Effekte nicht auf. Zurückzuführen ist dies auf eine geringere Expression des PPAR α in der Leber und auf eine schwächere Reaktion der Zielgene. Die Proliferation der Peroxisomen bleibt aus oder erfolgt lediglich gemäßigt (Holden und Tugwood 1999; Ringseis et al. 2009; Eder und Ringseis 2010).

2.3.1.1 PPAR α im Inflammationsgeschehen

Der PPAR α greift regulierend in das Inflammationsgeschehen ein (Delerive et al. 2001; Bosscher et al. 2006; Yang et al. 2008). Werden PPAR α defiziente Mäuse inflammatorischen Stimuli ausgesetzt, so zeigen sie eine verlängerte Entzündungsantwort im Vergleich zum Wildtyp (Devchand et al. 1996). Die antiinflammatorischen Effekte des PPAR α werden über die Repression des Transkriptionsfaktors NF- κ B erzielt (Staels et al. 1998; Delerive et al. 2000; Delerive et al. 2001; Delerive et al. 2002; Romics et al. 2004; Bosscher et al. 2006; Yang et al. 2008). Dafür sind zwei mögliche Mechanismen beschrieben.

Die erste Möglichkeit ist die direkte Protein-Protein Interaktion zwischen PPAR α und p65. Die gebildeten Komplexe sind transkriptionell inaktiv (Delerive et al. 1999;

Delerive et al. 2001). Die Repression ist LBD abhängig und erfolgt durch Bindung an die RHD von NF- κ B (Delerive et al. 1999). Außerdem wurden mit der Aktivierung des PPAR α gesteigerte I κ B α Konzentrationen in Zusammenhang gebracht (Delerive et al. 2000; Delerive et al. 2001). Fibrate, synthetische PPAR α Aktivatoren, induzierten die Expression des Inhibitorproteins I κ B α sowohl *in vitro* als auch in der Leber von Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte in PPAR α defizienten Mäusen kein signifikanter Anstieg der I κ B α mRNA beobachtet werden. Weiterführend wurde in einem *in vitro* Versuch eine p65 Kerntranslokation durch die Behandlung mit IL-1 β induziert. Interessanterweise wurde die Kerntranslokation von dem I κ B α Anstieg nicht beeinflusst. Die Sequestrierung von NF- κ B im Zytoplasma wurde demnach nicht gesteigert. Stattdessen war die DNA Bindungsaktivität von NF- κ B reduziert (Delerive et al. 2000). Begründet ist dies durch den Umstand, dass I κ B α nicht nur im Zytoplasma akkumuliert, sondern auch im Nukleus (Zabel und Baeuerle 1990; Arenzana-Seisdedos et al. 1995).

Eine weitere Verknüpfung besteht zwischen dem PPAR α und Stress im endoplasmatischen Retikulum. Erste Hinweise darauf erbrachten Han et al. (2008). Macelignan, ein Extrakt des Muskatnussbaumes und PPAR α / γ Agonist, war in der Lage ER Stress in der Leber und im weißem Fettgewebe von Mäusen zu reduzieren. In humanen hepatokarzinomen Zellen (HepG2) konnten Tang et al. (2014) ebenfalls das Abschwächen von ER Stress durch PPAR α beobachten. ER Stress kann durch das erhöhte Aufkommen von ROS induziert werden. Dies führt zum Untergang der Zelle (Hayashi et al. 2003; Moon et al. 2011). Die Zellstimulation mit H₂O₂ bewirkt über das Hochregulieren von BiP und CHOP die Induktion von ER Stress vermittelter Apoptose. Durch den Einsatz eines PPAR α Agonisten konnte die Expressionssteigerung von BiP und CHOP auf transkriptioneller und translationaler Ebene nach H₂O₂ Zellstimulation verhindert werden. Auch die Translokation von CHOP vom Zytoplasma in den Nukleus wurde geblockt. Der Einsatz eines PPAR α Antagonisten erbrachte stattdessen gegenteilige Effekte. Er erhöhte die Apoptoserate (Tang et al. 2014).

2.3.2 Fibroblast growth factor 21

Bei dem *Fibroblast growth factor 21* (FGF21) handelt es sich um einen hormonellen Faktor der FGF-Familie, der eine Schlüsselfunktion im Energiestoffwechsel einnimmt

(Gomez-Samano et al. 2016). Seine Expression findet hauptsächlich in der Leber statt. Weiterhin kommt er im Pankreas, im weißem Fettgewebe und in der Skelettmuskulatur vor (Nishimura et al. 2000; Izumiya et al. 2008; Wang et al. 2008). Physischer Stress und metabolische Imbalancen führen zu einer gesteigerten hepatischen Expression des FGF21 (Gomez-Samano et al. 2016). FGF21 stimuliert daraufhin die Fettoxidation, die Ketogenese und die Gluconeogenese in der Leber (Badman et al. 2007).

Die Aktivität des FGF21 wird sowohl über die zelluläre Stressantwort als auch den Fettstoffwechsel reguliert. Die Verbindung zum Fettstoffwechsel besteht über PPAR α . Es hat sich gezeigt, dass FGF21 in Zuständen des Fastens PPAR α -abhängig aktiviert wird (Badman et al. 2007; Inagaki et al. 2007; Lundasen et al. 2007). In PPAR α -*knockout* Mäusen führt die Verabreichung von FGF21 zu einer signifikanten Reduktion einer durch Fasten hervorgerufenen Fettleber (Inagaki et al. 2007). Während des Fastens werden freie Fettsäuren von der Leber aufgenommen. Ein Teil davon wird wieder zu Triglyceriden verestert (Baar et al. 2005). FGF21 führt über die Induktion von Lipasen zu einer Hydrolyse der gespeicherten Triglyceride. Das Risiko der Entwicklung einer Fettleber wird somit gesenkt (Inagaki et al. 2007). Hepatisches FGF21 wird nicht nur durch Hungern induziert, sondern auch durch eine fettreiche, kohlenhydratarme, ketogene Diät (KD). Adenoviraler *knockdown* des hepatischen FGF21 führt in KD-gefütterten Mäusen zu Fettleber, Lipämie und reduzierten Serum-Ketonkörpern (Badman et al. 2007). Neben der Aktivierung des FGF21 durch nutritive Faktoren, erfolgt auch eine Beeinflussung durch oxidativen Stress (Gomez-Samano et al. 2016). Stress im endoplasmatischen Retikulum führt zu einer Induktion des FGF21. Die Regulation erfolgt dabei über die PERK/eIF2 α /ATF4 Kaskade. *In silico* Analysen zeigten zwei Bindungsstellen für ATF4 in der FGF21-Promotorregion (Schaap et al. 2013). Einen weiteren Zusammenhang zwischen FGF21 und oxidativen Stress stellten Furusawa et al. (2014) her. Nrf2 reguliert FGF21 positiv. Nach Nrf2-Induktion über genetischen *Keap1-knockdown*, können in diabetischen Mäusen erhöhte FGF21-Plasmaspiegel und gesteigerte FGF21-Expressionen in der Leber gemessen werden (Furusawa et al. 2014).

2.4 Sekundäre Pflanzenstoffe

Unter sekundären Pflanzenstoffen versteht man eine Gruppe diverser chemischer Verbindungen, die von Pflanzen produziert werden (El Gharras 2009; Tyagi et al. 2010). Sie dienen Pflanzen unter anderem als Abwehrstoffe, Lockstoffe, Allelopathika und UV Protektoren (Crozier et al. 2006). Obwohl sie keine nutritiven Eigenschaften besitzen, wird ihnen aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Wirkungen großes Interesse entgegen gebracht (Dillard und German 2000; El Gharras 2009; Tyagi et al. 2010).

Nachfolgend wird auf die in der vorliegenden Arbeit verwendeten sekundären Pflanzenstoffe näher eingegangen. Dies sind zum einen die in Trauben und Hopfen enthaltenen Polyphenole und zum anderen ätherische Öle, welche jeweils dem Futter der Ferkel zugesetzt wurden.

2.4.1 Polyphenole

Polyphenole sind aromatische Verbindungen, die eine oder mehrere direkt an einen aromatischen Ring gebundene Hydroxygruppen enthalten. In pflanzlichen Nahrungsmitteln sind Polyphenole weit verbreitet. Besonders reichhaltig kommen sie in Früchten, Gemüse, Leguminosen, Getreide, Wein, Tee und Kakao vor (Manach et al. 2004; Rahman et al. 2006; Han et al. 2007). Vor allem die organoleptischen Charakteristiken wie Farbe und Geschmack, werden von den Polyphenolen bestimmt (Cheynier 2005). Vier Klassen können unterschieden werden, welche sich weiter in verschiedene Subklassen auftrennen: Phenolische Säuren (Hydroxybenzoesäure und Hydroxyzimtsäure), Flavonoide (Flavonole, Flavone, Flavanole, Flavanone, Isoflavone und Proanthocyanidine), Stilbene und Lignane (Manach et al. 2004; Manach et al. 2005; El Gharras 2009; Tangney und Rasmussen 2013).

2.4.1.1 Polyphenole in Trauben

Trauben sind sehr reich an phenolischen Verbindungen. Die höchsten Konzentrationen befinden sich in Schalen, Stielen, Blättern und Kernen (Pastrana-Bonilla et al. 2003; Makris et al. 2008; Xia et al. 2010). Proanthocyanidine, auch als kondensierte Tannine bezeichnet, sind die Hauptvertreter der Polyphenole in Trauben

(El Gharras 2009; Hernández-Jiménez et al. 2009). Es handelt sich dabei um die polymere Form der Flavanole (El Gharras 2009). Sie verleihen den Trauben ihre Farbe und sind aufgrund ihrer Eigenschaft, mit Speichelproteinen Komplexe zu bilden, für den adstringierenden Charakter der Früchte verantwortlich. Auch basiert der bittere Geschmack von Schokolade auf diesen Verbindungen (El Gharras 2009; Xia et al. 2010). Proanthocyanidine sind vor allem in der Schale und den Kernen enthalten. In Traubentrester kommen sie nur zu einem sehr geringen Anteil vor. Dort finden sich hingegen signifikante Gehalte Flavon-ähnlicher Stoffe, den Anthocyanen (Cyanidin-3-Glucosid, Malvidin-3-Glycosid, Cyanidin und Peonidin) (Auger et al. 2004). Des Weiteren sind monomere Formen der Flavanole (Catechin, Epicatechin, Gallocatechin, Epigallocatechin, Epicatechin-3-Gallat und Epigallocatechin-3-Gallat) in Trauben enthalten (Auger et al. 2004; El Gharras 2009). Zu geringem Teil wird der Polyphenolgehalt in Trauben durch Gallussäure bestimmt (Auger et al. 2004).

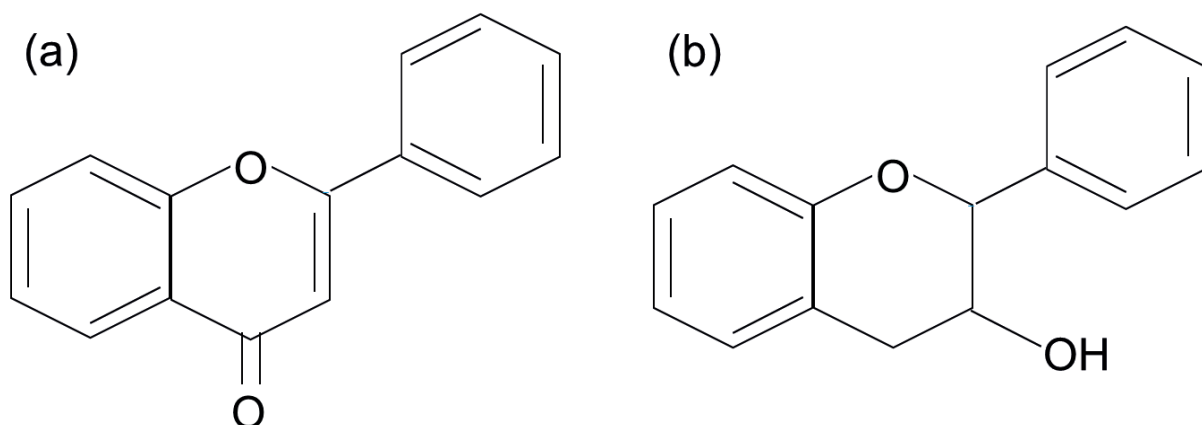


Abbildung 6: Grundstruktur der Flavone (a) und Flavanole (b)

Traubenpolyphenole wirken sich positiv auf die Gesundheit aus, da sie antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften besitzen (Terra et al. 2009). So fungieren Phenolverbindungen in Trauben als Radikalfänger (Shi et al. 2003) und Inhibitoren der Lipidoxidation (Sato et al. 1996; Meyer et al. 1997). Sie wirken sich aber auch auf Signalwege und der damit in Verbindung stehenden Genexpression aus. Polyphenole können die NFκB-Aktivität modulieren. In murinen intestinalen Epithelzellen wurde gezeigt, dass einige Flavonoide die Phosphorylierung oder Ubiquitinierung von Kinasen inhibieren können und somit die Degradation von IκB verhindern. NF-κB ist dann nicht mehr in der Lage, in den Kern zu translozieren und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen zu fördern. Auch eine Inhibition der Interaktion von NF-κB Untereinheiten mit ihrer Ziel-DNA durch Flavonoide ist beschrieben (Ruiz und

Haller 2006). Gessner et al. (2012) zeigten, dass Extrakte aus Traubenkernen und Traubentrestern die TNF α induzierte NF- κ B Transaktivierung in intestinalen Epithelzellen (Caco-2) signifikant reduzieren konnten. In diesem Zusammenhang wurde auch eine verminderte Expression von TNF α induzierten NF- κ B Zielgenen beobachtet. Bei Ratten, welche einer *high-fat* Diät unterzogen wurden, konnte der Fütterungszusatz eines Proanthocyanidinextrakts aus Traubenkernen die normalerweise bei Obesitas auftretende Entzündungsreaktion des Körpers verhindern (Terra et al. 2009). Neben der hemmenden Wirkung auf den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B können Traubenpolyphenole auch direkt den zytoprotektiven Nrf2/ARE Signalweg stimulieren. Traubenkern-Proanthocyanidine bewirkten in humanen hepatokarzinomen Zellen (HepG2) eine Induktion der Nrf2 Expression, eine ARE vermittelte Transkriptionsaktivierung und somit die Expressionssteigerung Phase II und antioxidativer Gene (Bak et al. 2012). Ein weiterer stressresponsiver Signalweg wird durch Stress im endoplasmatischen Retikulum aktiviert. Auch dieser kann durch Traubenpolyphenole positiv beeinflusst werden. Ha et al. (2014) untersuchten die Auswirkungen von Polyphenolen aus muscadinen Trauben auf ER-Stress, der durch Thapsigargin in humanen retinalen Pigmentepithelzellen (ARPE-19) ausgelöst wurde. Die Signaltransduktion durch ER-Stress und der apoptotische Zelltod konnten durch die Traubenpolyphenole effektiv reduziert werden.

2.4.1.2 Polyphenole in Hopfen

Hopfen, *Humulus lupulus*, gehört zur Familie der *Cannabaceae*. Der weibliche Blütenstand, der im allgemeinen Sprachgebrauch als „Hopfen“ bezeichnet wird, ist reich an polyphenolischen Verbindungen (Zanoli und Zavatti 2008; Shah et al. 2010). Hauptvertreter sind auch hier die Proanthocyanidine (Wang et al. 2014). Weitere Flavonoide in Hopfen sind die Flavonole (Kaempferol, Rutin, Quercetin, Quercitrin), Flavone (Hyperoside) und Flavanole in Form von Catechinen (Catechin-Gallat, Epicatechin-Gallat) (Zanoli und Zavatti 2008; Wang et al. 2014). Chalkone sind Vorstufen der Flavonoide (Nowakowska 2007). Auch diese sind in Hopfen enthalten. Am bedeutsamsten ist hierbei das Xanthohumol (Stevens und Page 2004). Weitere Polyphenole im Hopfen sind das zu den Stilbenen gehörige (El Gharras 2009) Resveratrol und die Gallussäure (Wang et al. 2014). Neben den Polyphenolen sind

noch andere sekundäre Pflanzenstoffe im Hopfen vertreten. Die α - und β -Säuren verleihen dem Hopfen seinen bitteren Geschmack (Ceh et al. 2007). Doch ist das Hopfenaroma eine sehr komplexe Mischung. Auch Terpenoide, die im ätherischen Öl des Hopfens enthalten sind, tragen zu dem Aroma bei (Malizia et al. 1999; Eri et al. 2000).

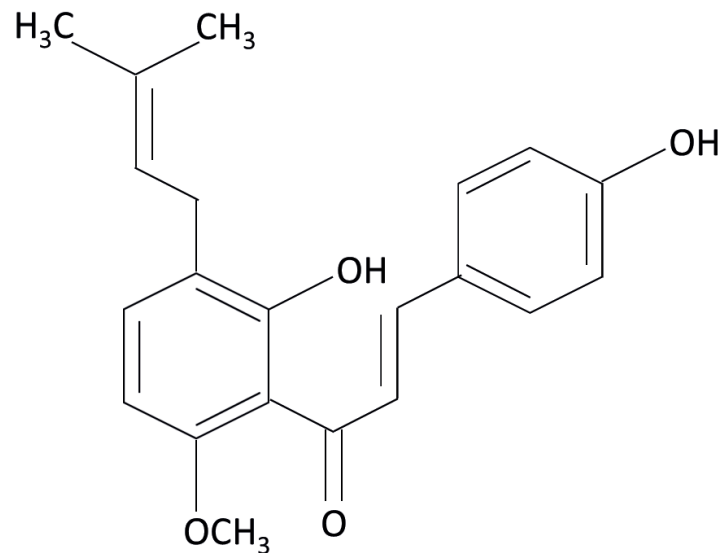


Abbildung 7: Strukturformel des Xanthohumols

Seine populärste Verwendung findet Hopfen in der Brauindustrie. Außerdem wurde er lange für medizinische Zwecke bei Schlafstörungen, als mildes Sedativum und zur Aktivierung der Magenfunktion als bitteres Magenmittel eingesetzt (Zanoli und Zavatti 2008). Den Hopfenpolyphenolen wird ähnlich großes gesundheitsförderndes Potenzial wie den Traubenpolyphenolen nachgesagt (Wang et al. 2014), da sie antioxidative und detoxifizierende Eigenschaften aufweisen (Dietz et al. 2005). Dabei gilt das größte Forschungsinteresse dem Xanthohumol (Zanoli und Zavatti 2008), das nur in Hopfen vorkommt (Yao et al. 2015). Xanthohumol tritt, wie andere Polyphenole, als Radikalfänger auf und besitzt antiinflammatorische Aktivität (Lee et al. 2011). *In vitro* konnten Lee et al. (2011) und Yao et al. (2015) eine Aktivierung des zytoprotektiven Nrf2-ARE Signalweges nachweisen. Damit verbunden war auch die transkriptionelle Hochregulation von detoxifizierenden Phase II Genen. Xanthohumol modifiziert die Cysteinreste des Nrf2-Repressorproteins Keap1 durch Alkylierung (Dietz et al. 2005). Eine direkte Bindung von Keap1 durch Xanthohumol wird ebenfalls suggeriert (Dietz et al. 2005). Xanthohumol ist teilweise oral bioverfügbar und akkumuliert in der Leber und in der Milchdrüse (Dietz et al. 2013). Dietz et al. (2013) konnten eine signifikante Induktion von NQO1 im Lebergewebe von Ratten, verursacht sowohl durch ein

Hopfenextrakt als auch durch Xanthohumol, nachweisen. In mit hepatotoxischen Tetrachlorkohlenstoff behandelten Mäusen konnte die orale Gabe von Xanthohumol die provozierte Leberentzündung und Fibrose durch eine verminderte NF- κ B Aktivität abmildern (Dorn et al. 2012). Auch in humanen Endothelzellen (Albini et al. 2006) und humanen Leukämiezellen (Harikumar et al. 2009) wurde eine verminderte TNF-induzierte NF- κ B Aktivierung beschrieben. Harikumar et al. (2009) zeigten, dass Xanthohumol die TNF induzierte I κ B α Phosphorylierung und Degradation hemmt. Durch Interaktion mit Cysteinresten wird die Aktivierung der IKK gehemmt. Ebenso ist die Inhibition von NF- κ B durch Interaktion mit Cysteinresten der p65 Untereinheit möglich. Eine antiproliferative Funktion von Xanthohumol ist die Potenzierung der Apoptose durch Runterregulation antiapoptotischer Gene (Harikumar et al. 2009). Außerdem wurde *in vitro* der proapoptotische Arm der UPR bei ER Stress durch Xanthohumol gefördert (Lust et al. 2009).

2.4.2 Ätherische Öle

Ätherische Öle sind aromatische, flüchtige und ölige Flüssigkeiten pflanzlicher Herkunft (Burt 2004; Arvind und Vyas 2013). Sie schützen die Pflanzen vor Herbivoren und Pathogenen oder besitzen eine anziehende Wirkung auf Bestäuber und erbringen so einen Fortpflanzungsvorteil (Dudareva et al. 2006). Der strukturelle Aufbau der ätherischen Öle lässt sich auf zwei Verbindungsklassen zurückführen: Den Terpenen und den Phenylpropanen. Terpene bestehen aus Isopreneinheiten, welche jeweils aus fünf Kohlenstoffatomen zusammengesetzt sind. Anhand dieser können die Terpene weiter subklassifiziert werden. Man unterscheidet Mono-, Sesqui- und Diterpene, die aus zwei, drei bzw. vier Isopreneinheiten aufgebaut sind. Auch eine Unterscheidung anhand des Vorhandenseins einer Ringstruktur oder von Doppelbindungen ist möglich. Das Grundgerüst der Phenylpropane besteht aus einem sechsgliedrigem aromatischen Ring mit einer drei Kohlenstoffatomen starken Seitenkette (Lee et al. 2004). Eingesetzt werden ätherische Öle in der Aromatherapie, in Lebensmitteln als Aromastoffe, sowie in Parfümen, Kosmetika und Pharmazeutika (Burt 2004; Başer und Demirci 2007).

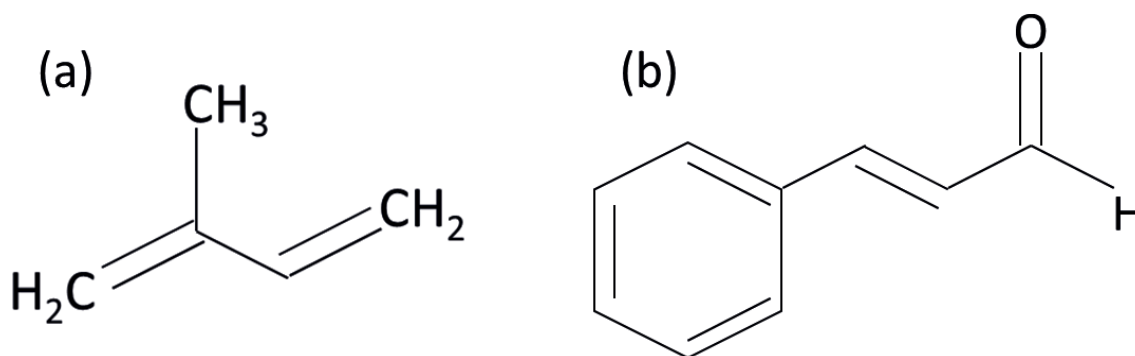


Abbildung 8: Isopren (a) als Grundgerüst der Terpene und Zimtaldehyd (b) als Vertreter der Phenylpropane

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass Pflanzen wie Thymian (*Thymus vulgaris*), Oregano (*Origanum vulgare*), Teebaum (*Melaleuca alternifolia*), Zitronengras (*Cymbopogon citratus*), Pfefferminz (*Mentha piperita*), Basilikum (*Ocimum basilicum*), Schafgarbe (*Achillea millefolium*) etc. antimikrobielle und antioxidative Aktivitäten besitzen. Dies ist auf flüchtige Verbindungen (Carvacrol, Eukalyptol, Kampfer, α -Terpineol, β -Pinene, Borneol, Linalool, Thymol) zurückzuführen (Candan et al. 2003; Sartoratto et al. 2004; Prabuseenivasan et al. 2006; Soković et al. 2007; El Abed et al. 2014). Auch antiinflammatorische Wirkungen werden mit ätherischen Ölen in Verbindung gebracht (Miguel 2010). *In vitro* sind ausgewählte Phenylpropanoide in der Lage die NF- κ B Signalkaskade zu hemmen (Bremner et al. 2004; Tabanca et al. 2007). Die Aktivitätsminderung von NF- κ B durch ätherische Öle steht im Zusammenhang mit der Hemmung der I κ B α Degradation (Chainy et al. 2000; Lin et al. 2008; Yoon et al. 2010). Die Translokation von p50 (Lin et al. 2008) bzw. p50/p65 (Yoon et al. 2010) in den Nukleus wird somit reduziert. Des Weiteren kann Citral, Bestandteil von Zitronengras, den Transkriptionsfaktor PPAR α aktivieren (Katsukawa et al. 2010). Der antiinflammatorische Effekt von PPAR α besteht in der Hemmung von NF- κ B (Miguel 2010). Der zytoprotektive Gegenspieler von NF- κ B ist der antioxidative Transkriptionsfaktor Nrf2. In humanen hepatokarzinomen Zellen (HepG2) konnten die in Knoblauch enthaltenen ätherischen Öle, insbesondere die Komponente Diallyltrisulfid, die Expression der detoxifizierenden Gene NQO1 und HO1 steigern (Chen et al. 2004). Ätherische Öle können auch direkt als Radikalfänger fungieren (Miguel 2010). Die Bestimmung ihrer antioxidativen Kapazität via *Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay* zeigte hierbei in den Studien von Dandlen et al. (2010) und Viuda-Martos et al. (2010) eine hohe Aktivität.

Bei abgesetzten Ferkeln und Broilern können die Leistungsdaten durch die Verwendung von ätherische Ölen in der Fütterung günstig beeinflusst werden. Verbesserungen von bis zu 10 % bei der Gewichtszunahme und bis zu 3 % bei der Futterverwertung sind für abgesetzte Ferkel beschrieben (Zeng et al. 2015).

3 Zielstellung

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung der Hypothese, dass sich der Zusatz von phytogenen Futterkomponenten positiv auf das Inflammationsgeschehen in der Leber beim Ferkel während der kritischen Absetzphase auswirkt. Die Untersuchung sollte auf molekularbiologischer Ebene stattfinden. Zu diesem Zweck wurden Leber- und Plasmaproben von zwei Tierversuchen verwendet. Im ersten Versuch wurden polyphenolhaltige Futterkomponenten zugesetzt. Die Polyphenolquellen waren Traubentrester oder Hopfentreber. In der humanen Ernährung werden Polyphenole gesundheitsfördernde Eigenschaften mit dem Potenzial zur Prävention von Erkrankungen, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, zugesprochen. Beispiele sind kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs, Diabetes mellitus und neurodegenerative Krankheiten (Han et al. 2007; Lewandowska et al. 2013; Li et al. 2014a). Über den Einsatz polyphenolhaltiger Futterkomponenten bei Nutztieren ist hingegen wenig bekannt. Insbesondere die systemische Wirkung ist nicht hinreichend erforscht. Für Ferkel konnten erste positive Auswirkungen dieser Zusätze auf die Darmgesundheit nachgewiesen werden. Gessner et al. (2013) zeigten, dass der Zusatz eines Extrakts aus Traubenkernen und Traubentrester (GSGME, *grape seed and grape marc meal extract*) die Futterverwertung bei abgesetzten Ferkeln verbessern kann. Des Weiteren war das Verhältnis von Zottenhöhe zu Kryptentiefe im Vergleich zu den Kontrolltieren verbessert. Die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene hingegen vermindert. Die Untersuchungen bezogen sich auf das Duodenum. Fiesel et al. (2014) nutzten ebenfalls GSGME, sowie die weitere kostengünstige Polyphenolquelle Hopfentreber in der Fütterung abgesetzter Ferkel. Auch hier war die Futterverwertung der Tiere, die polyphenolhaltige Zusätze erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert. Dieser Unterschied war bei Hopfentreber signifikant; beim Zusatz GSGME zeigte sich eine Tendenz. Das Inflammationsgeschehen im Darm wurde durch die phytogenen Futterkomponenten positiv beeinflusst. Die Expression ausgewählter proinflammatorischer Zytokine, reguliert durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B, war in Duodenum, Ileum und Colon *ascendens* bei den Tieren, die GSGME oder Hopfentreber erhalten haben, im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert. Zusätzlich wurde den Polyphenolen antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen. Die Darmmorphologie wurde durch die Zusätze entgegen der früheren Studie (Gessner et

al. 2013) nicht beeinflusst. Weiterführend zu der Studie von Fiesel et al. (2014) sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die antiinflammatorischen Eigenschaften der phytogenen Zusätze GSGME und Hopfentreber auch systemische Auswirkungen haben. Aus diesem Zweck wurden auf molekularbiologischer Ebene stressresponsive Signalwege in Leberproben der Ferkel untersucht. Zusätzlich wurden antioxidative Parameter im Plasma der Tiere bestimmt.

Dem zweiten Versuch unterliegt ein anderes Versuchsmodell. Auch hier wurde ein phytogener Futterzusatz eingesetzt. Verwendet wurde ein Präparat, das ätherische Öle enthält. Bei dem Präparat handelte es sich um eine Mischung aus Matrix-verkapselten phytogenen Substanzen. Die Hauptbestandteile waren Carvacrol, Thymol und Limonen. Die Wirkung des Präparats wurde zu verschiedenen Zeitpunkten getestet. Dafür wurden Proben zum Zeitpunkt des Absetzens, sowie drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen gewonnen und miteinander verglichen. Außerdem wurden die Tiere, die ätherische Öle als Futterzusatz erhielten, mit Kontrolltieren verglichen. Wie Polyphenole besitzen auch ätherische Öle aufgrund ihrer antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften das Potenzial, sich positiv auf die humane Gesundheit auszuwirken (Edris 2007; Miguel 2010). Bei Nutztieren, genauer Broilern und Ferkeln, konnte vereinzelt eine verbesserte Wachstumsleistung und geänderte Zusammensetzung der Darmmikroben durch ätherische Öle im Futter nachgewiesen werden (Zeng et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese, dass der Einsatz ätherischer Öle während der Absetzphase beim Ferkel günstige Auswirkungen auf den Organismus hat, überprüft werden. Hintergründe für diese Hypothese sind die Erkenntnisse aus dem humanen Bereich, sowie erste Hinweise bei Nutztieren. Die Untersuchungen haben Bezug auf das Inflammationsgeschehen und den Fettstoffwechsel, da in der Absetzphase ein gesteigertes Inflammationsgeschehen (Campbell et al. 2013) und eine Fettmobilisation (Fenton et al. 1985) stattfinden.

4 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit basiert auf zwei Versuchsmodellen.

Im ersten Ferkelversuch wurden die polyphenolhaltigen Futterkomponenten Hopfentreber und Traubentrester eingesetzt und mit einer Kontrollgruppe, welche lediglich die Futtergrundmischung erhielt, verglichen. Im Fokus stand die Auswirkung von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Parameter der Stressantwort.

Dem zweiten Ferkelversuch lag ein komplexeres Modell zugrunde. Der Einsatz von ätherischen Ölen in der Fütterung wurde im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu vier verschiedenen Zeitpunkten getestet. Augenmerk lag auf Signalwegen der Stressantwort und des Lipidstoffwechsels.

4.1 Versuchstiere und Futter

4.1.1 Versuchstiere und Futter im Ferkelversuch 1

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 48 fünf Wochen alte Ferkel der Kreuzungsrasse Piétrain x (deutsche Landrasse x deutsches Edelschwein) mit einem initialen Körpergewicht von ca. 10 kg. Die Haltung erfolgte paarweise im Flatdeck unter kontrollierten klimatischen Bedingungen (Temperatur: 23 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 50 – 60 %). Das Lichtregime wurde auf eine 13stündige Tagphase zwischen 6:00 und 19:00 Uhr und eine elfstündige Nachtphase eingestellt. Die Ferkel wurden in drei Gruppen à 16 Tiere eingeteilt. Das Fütterungsregime war zweiphasig und beinhaltete zwei Futtergrundmischungen (Phase I: < 15 kg Körpergewicht, Phase II: > 15 kg Körpergewicht). Die Zusammensetzung der Futterrationen orientierte sich an den Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von wachsenden Schweinen von der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2006). Die Futterzusammensetzungen der beiden Phasen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Kontrollgruppe erhielt die Futtergrundmischungen ohne weitere Zusätze. Die Behandlungsgruppen bekamen die Futtergrundmischungen mit dem Zusatz von 1 % Hopfentreber (Anta®Phyt H, Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, Deutschland) oder 1 % Traubentrester (Anta®Ox E, Dr. Eckel GmbH, Niederzissen, Deutschland) im Austausch gegen Weizen. Der Gesamtpolyphenolgehalt der Futterzusätze wurde

nach der Methode von Singleton et al. (1999) bestimmt. Im Hopfentreber konnten 50,4 mg/g und im Traubentrester 61,6 mg/g Gallussäure-Äquivalent nachgewiesen werden. Die Fütterung erfolgte *ad libitum*. Um die tägliche Futteraufnahme zu kontrollieren, wurde nicht gefressenes Futter zurückgewogen. Wasser stand in Form einer Nippeltränke zur freien Verfügung. Der Fütterungsversuch wurde über vier Wochen durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere in Übereinstimmung mit dem Artikel 4 Absatz 3 des deutschen Tierschutzgesetzes (Deutsches Tierschutzgesetz, 2006) zu wissenschaftlichen Zwecken tierschutzgerecht getötet (JLU Nr. 439_M).

Tabelle 1: Zusammensetzungen der Futtergrundmischungen für den Ferkelversuch 1

	Phase I	Phase II
Zusammensetzung (g/kg)		
Weizen	381,7	406,9
Gerste	315	302
Soja (44 % XP)	250	240
Sojaöl	15	15
Vitamin- & Mineralvormischung ¹	33,5	33,4
Lysin HCL	2,6	1,5
Methionin	1,0	0,5
Threonin	1,2	0,7
Nährstoffkonzentrationen		
Metabolisierbare Energie (MJ/kg) [†]	12,99	13,04
Trockensubstanz (%) [‡]	88,41	88,35
Rohprotein (%) [‡]	19,58	19,13
Rohfaser (%) [‡]	3,99	3,94
Rohfett (%) [‡]	3,16	3,16
Rohasche (%) [‡]	3,11	3,06
verd. Lysin (%) [¥]	1,16	1,05
verd. Methionin + Cystein (%) [¥]	0,62	0,57
verd. Threonin (%) [¥]	0,69	0,63
verd. Tryptophan (%) [¥]	0,21	0,21

¹Die Vitamin- & Mineralvormischung (Bergin Novamast, Bergophor, Kulmbach, Deutschland) enthielt pro kg folgende Inhaltsstoffe: 40 g Lysin, 30.448 FYT 6-Phytase, 3.045 mg Eisen, 3.045 mg Mangan, 3.045 mg Zink, 609 mg Kupfer, 66 mg Jod, 13 mg Selen, 400.000 IE Vitamin A, 66.985 IE Vitamin D3, 3.045 mg Vitamin E, 76 mg Vitamin K, 76 mg Vitamin B1, 203 mg Vitamin B2, 152 mg Vitamin B6, 1.015 µg Vitamin B12, 1.015 mg Nikotinsäure, 507 mg Pantothersäure, 30 mg Folsäure, 4.060 µg Biotin, 10.149 mg Cholinchlorid. XP = Rohprotein; verd. = verdauliches. [†]Berechnung entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. [‡]Analysiert gemäß Fiesel et al. (2014) (Mittelwerte von drei Analysen pro Diät). [¥]Berechnet mithilfe tabellarischer Werte von AMINODat® 4.0 (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland).

4.1.2 Versuchstiere und Futter im Ferkelversuch 2

Um den Einfluss von ätherischen Ölen auf Parameter der Stressantwort und des Lipidstoffwechsels zu untersuchen, wurde ein Fütterungsversuch mit 96 gemischtgeschlechtlichen Ferkeln der Kreuzungsrasse Piétrain x (deutsche Landrasse x deutsches Edelschwein) durchgeführt. Die Ferkel wurden auf der Lehr- und Forschungsstation 'Oberer Hardthof' der Justus-Liebig-Universität Gießen geboren und bereits am Tag ihrer Geburt gewogen. Danach wurden die Tiere wöchentlich gewogen. Nach dem Absetzen am 21. Lebenstag erfolgte die Haltung am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter den gleichen klimatischen Bedingungen wie beim Ferkelversuch 1. Die Ferkel wurden in zwei Gruppen, Behandlung und Kontrolle, à 12 Tiere eingeteilt. Das Fütterungsregime war zweiphasig (Tabelle 2). Ab ihrem sechsten Lebenstag stand den Ferkeln ein Saugferkelbeifutter zur freien Verfügung. Im Falle der Behandlungsgruppe war diesem bereits das unten genannte Präparat mit ätherischen Ölen zugesetzt. Nach dem Absetzen wurde eine Futtergrundmischung für Ferkel bis 15 kg Körpergewicht *ad libitum* verwendet. Die Kontrollgruppe erhielt die Futtergrundmischung. Die Behandlungsgruppe bekam die Futtergrundmischung mit dem Zusatz von 0,015 % ätherischer Öle (Digestarom® P.E.P. MGE 150; BIOMIN Holding GmbH, Getzersdorf, Österreich) im Austausch gegen Weizen. Bei dem Futterzusatz handelte es sich um eine Mischung phytogener Substanzen. Die Hauptbestandteile waren laut Hersteller Carvacrol, Thymol und Limonen. Die Schlachtungen wurden an vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Dies waren der Tag des Absetzens, sowie drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen. Zum Zeitpunkt des Absetzens wurden aus jeder Gruppe 12 Tiere geschlachtet. Die verbleibenden 72 Ferkel wurden in Kleingruppen zu jeweils 6 Tieren pro Box (sechs Boxen pro Gruppe) gehalten. Bei den Schlachtungen drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen wurden jeweils 12 Tiere getötet. Die Tötung der Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte in Übereinstimmung mit dem Artikel 4 Absatz 3 des deutschen Tierschutzgesetzes (Deutsches Tierschutzgesetz, 2006) (JLU Nr. 494_M). Aus labortechnischen Gründen wurde die Gruppengröße bei den durchgeführten Analysen auf neun Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt reduziert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Futtergrundmischungen für den Ferkelversuch 2

	Saugferkelbeifutter	Ferkelaufzuchtfutter
Zusammensetzung (g/kg)		
Soja (42,5%XP)	224,2	230
Haferflocken	200,8	-
Gerste	192,9	259,5
Weizen	170	440
Magermilchpulver	160	-
Vitamin- & Mineralvormischung ¹	23,5	33,5
Sojaöl	20	20
Monocalciumphosphat	5,5	7,5
Methionin	1,4	1,5
Threonin	0,6	2,2
Lysin HCL	0,6	4,3
Tryptophan	0,3	0,5
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,2	-
Cholinchlorid 50%	-	1,0
Nährstoffkonzentrationen		
Metabolisierbare Energie (MJ / kg) [†]	13,91	12,99
Trockensubstanz (%) [‡]	89,67	87,75
Rohprotein (%) [‡]	22,25	19,08
Rohfaser (%) [‡]	3,31	3,96
Rohfett (%) [‡]	4,45	3,63
Rohasche (%) [‡]	6,43	6,50
verd. Lysin (%) [¥]	1,26	1,25
verd. Methionin + Cystein (%) [¥]	0,77	0,66
verd. Threonin (%) [¥]	0,76	0,73
verd. Tryptophan (%) [¥]	0,25	0,22

¹Die Vitamin- & Mineralvormischung (Bergin EcoMast M, Bergophor, Kulmbach, Deutschland) enthielt pro kg folgende Inhaltsstoffe: 60 g Lysin, 5 g Methionin, 5 g Threonin, 30.000 FYT 6-Phytase, 3.000 mg Eisen, 3.000 mg Mangan, 3.000 mg Zink, 600 mg Kupfer, 65 mg Jod, 13 mg Selen, 400.000 IE Vitamin A, 66.000 IE Vitamin D3, 3.000 mg Vitamin E, 75 mg Vitamin K, 75 mg Vitamin B1, 200 mg Vitamin B2, 150 mg Vitamin B6, 1.000 µg Vitamin B12, 1.000 mg Nikotinsäure, 500 mg Ca-D-Pantothemat, 30 mg Folsäure, 2.000 µg, Biotin, 10.000 mg Cholinchlorid, 75 mg Propylgallat, 25 mg Tocopherole. XP = Rohprotein; verd. = verdauliches. [†]Berechnung entsprechend der Empfehlung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie. [‡]Analysiert gemäß Fiesel et al. (2014) (Mittelwerte von drei Analysen pro Diät).

*Berechnet mithilfe tabellarischer Werte von AMINODat® 4.0 (Evonik Industries AG, Essen, Deutschland).

4.2 Probengewinnung

Die Probengewinnung erfolgte beim Ferkelversuch 1 nach vier wöchiger Versuchsphase. Beim Ferkelversuch 2 hingegen an vier verschiedenen Zeitpunkten (null, drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen). Vor der Probenentnahme erfolgte die Betäubung mittels Elektrozange (Betäubungsgerät FBT 2012 – B, Fuhrmann Elektrotechnik GmbH, Deutschland) und Tötung durch Ausbluten. Für die Blutproben wurden EDTA Polyethylenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) verwendet. Die Gewinnung von Plasma erfolgte dann durch zehnminütige Zentrifugation bei 4 °C mit 1100 g. Die Plasmaproben wurden anschließend bei -20 °C gelagert. Die Leberproben wurden bei -80 °C bis zu den Analysen aufbewahrt.

4.3 Materialien

4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papier Rotilabo®	Carl Roth GmbH, Deutschland
CELLSTAR® Mikroplatten (96-Well Format)	Greiner Bio-One, Deutschland
Fiber Pads	Bio-Rad, Deutschland
G:BOX (Lumineszenzimager)	SYNGENE, Großbritannien
GeneFlash (UV-Licht-Imager)	SYNGENE, Großbritannien
Heidolph Duomax 1030 (Schwenker)	Heidolph Instruments, Deutschland
HERAEUS Fresco 21 Centrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Deutschland
HERAEUS Incubator	Thermo Scientific, Deutschland
HERAEUS Varifuge K	Heraeus-Christ GmbH, Deutschland
LS 55 Fluorescence Spectrometer	Perkin Elmer, Großbritannien
Magnetrührer IKA® RCT Classic	IKA®-Werke, Deutschland
Mikrozentrifuge GalaxyMiniStar	VWR, Deutschland
Mini-Elektrophoresesystem (Hoefer SE 250 Mighty Small II)	Hoefer Inc., USA
NanoQuant plate™	TECAN Austria GmbH, Österreich
Nitrozellulosemembran BioTrace™ NT	Pall, Deutschland

PCR-Tubes (0,1 ml)	LTF Labortechnik, Deutschland
Plattenreader TECAN infinite M200	TECAN Austria GmbH, Österreich
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Sarstedt, Deutschland
Rotorgene 2000	Corbett Research, Australien
Sartorius EB35EDE-I Waage	Sartorius Stedim Biotech GmbH
Schüttelwasserbad	JULABO Labortechnik, Deutschland
Sonorex Ultraschallbad	Bandelin electronic, Deutschland
Thermocycler Tprofessional BASIC	Biometra GmbH, Deutschland
Thermoschüttler	Eppendorf AG, Deutschland
TissueLyser	Qiagen GmbH, Deutschland
Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Varian Deutschland GmbH, Deutschland
Vortex-Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments, Deutschland
VWR® Digital Heatblock	VWR International GmbH, Deutschland
Western Trans-Blot System (Mini Trans-Blot® Cell)	Bio-Rad, Deutschland

4.5 Verwendete Reagenzien

1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
2-Thiobarbitursäure	TCI Europe, Belgien
2,2-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat] (ABTS®)	Merck Millipore, Deutschland
5-fach Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega GmbH, Deutschland
5-fach Puffer für cDNA-Synthese	Fermentas GmbH, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Butylhydroxytoluol (BHT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Bicinchoninsäure Assay Reagent A/BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima Interchim, Frankreich
Chloroform	Carl Roth GmbH, Deutschland
Contronorm®	Analyticon Biotechnologies AG, Deutschland

Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	GeneCraft, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Detergent	Active Motif, USA
Dithiothreitol 1 M (DTT)	Active Motif, USA
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethanol 1 % Methylethylketon (MEK) vergällt	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Fluitest TG®	Analyticon Biotechnologies AG, Deutschland
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, USA
GeneRuler™ 100 bp	Fermentas GmbH Deutschland
Glycin	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Hypotonic Buffer 10 x	Active Motif, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Kaliumperoxodisulfat	Merck Millipore, Deutschland
KAPA™ SYBR® FAST QPCR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
konzentrierte Essigsäure	Carl Roth GmbH, Deutschland
Lysis Buffer AM1	Active Motif, USA
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Deutschland
MasterMix for Bio-Rad iCycler™	Deutschland
Methanol HPLC-Grade	Merck Millipore, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Deutschland
n-Hexan Rotisolv HPLC	Carl Roth GmbH, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif Europe, Belgien

Oligo-dT-18 Primer	Eurofins MWG Operon, Deutschland
ortho Phosphorsäure 85 %	Merck Millipore, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, Deutschland
peqGOLD Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Active Motif, USA
Protein Quantitation Kit, BC-Assay	Interchim, Frankreich
Pyrogallol 1 %ig in Lösung	Merck Millipore, Deutschland
Reagent A + B	
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas GmbH, Deutschland
Roti-Load®, Proteinauftragpuffer, reduzierend	Carl Roth GmbH, Deutschland
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid)	Carl Roth GmbH, Deutschland
TRIS	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
TRIzol® Reagent	Invitrogen GmbH, Deutschland
Trolox®	EMD Chemicals, USA
Tween® 20 pure	SERVA Elektrophoresis GmbH, Deutschland

4.6 Verwendete Puffer

50x TAE-Puffer	242 g Tris wurden mit 57,1 ml Essigsäure, 100 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0) versetzt und auf 1 Liter mit Reinstwasser aufgefüllt.
1x TAE-Puffer	40 ml 50 x TAE-Puffer wurden mit 1960 ml Reinstwasser aufgefüllt.
1x TBST	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20; pH 7,5

APS	0,1 g wurden in 900 µl Reinstwasser gelöst
DEPC-Wasser	0,1 % DEPC wurde in Reinstwasser gelöst, für 24 h im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und anschließend autoklaviert.
Ethanol + 1 % Pyrogallol	In 100 ml Ethanol wurden 1 g Pyrogallol gelöst.
gesättigte NaOH	NaOH wurde im Überschuss in bidestilliertem Wasser gelöst.
Methanol + 0,05 % BHT	In 100 ml Methanol wurden 0,05 g BHT gelöst.
Ponceau S	0,25 g Ponceau S wurden in 500 µl Eisessig und 46,5 ml Reinstwasser gelöst.
RIPA Puffer	2,5 ml Tris (1 M, pH 7,4), 6,85 ml NaCl (1 M), 5 ml Glycerol, 500 µl SDS (SDS 10 %), 5 ml Triton x 100, 0,1 ml EDTA (50mM), 12,5 ml Deoxycholate (Deoxycholate 2 %) wurden mit 21,15 ml sterilem H ₂ O versetzt.
Sammelgelpuffer	0,5 M TRIS; pH 6,8
SDS (10 %ig)	1 g SDS wurden mit 10 ml Reinstwasser gelöst.
SDS-Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS; pH 8,3

Transferpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M TRIS; pH 8,8

4.7 Methoden

4.7.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Lebergewebe erfolgte mit TRIzol® Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers. Im ersten Schritt, der Zellyse, wurden ca. 15 mg Lebergewebe mit 1 ml Trizol® versetzt und bei 17,5 Hz für fünf Minuten homogenisiert (Tissue Lyser, Qiagen GmbH, Deutschland). Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben zunächst bei Raumtemperatur drei Minuten inkubiert und dann 15 min bei 4 °C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Für die RNA-Präzipitation wurde die obere RNA-haltige Phase abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation für zehn Minuten bei 4 °C mit 13.000 U/min wurde der resultierende Überstand restlos abgenommen und entfernt. Das entstandene RNA-haltige Pellet wurde mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets für ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde das Pellet mithilfe von 50 µl DEPC-Wasser 10 min bei 60 °C mit 900 U/min im Thermoschüttler (Eppendorf AG, Deutschland) resuspendiert. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

4.7.1.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA und deren Reinheitsgrad wurden mit dem Tecan infinite M200-Spektrometer (TECAN Austria GmbH, Österreich) unter Verwendung einer NanoQuant plate™ bestimmt. Zunächst wurde die NanoQuant plate™ mit je 2 µl DEPC-Wasser pro Messfeld kalibriert. Anschließend wurden 2 µl jeder Probe zur Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm pipettiert. Die Konzentrationen wurden unter Verwendung der Software Tecan i-control ermittelt. Darüber hinaus wurde als Hinweis auf den Reinheitsgrad der gewonnenen RNA der Quotient aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

4.7.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte als selektive reverse Transkription der einzelsträngigen mRNA in komplementäre DNA. Je 1,2 µg RNA wurden mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 7,5 µl gebracht. Nach Zugabe des unten dargestellten Mastermixes (Tabelle 3) fand die cDNA-Synthese im Thermocycler (Biometra) statt. Hierbei handelte es sich zunächst um eine einstündige Inkubation bei 42 °C, dem Temperaturoptimum der reversen Transkriptase, mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 70 °C für 10 min. Abschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min gekühlt. Nach erfolgter cDNA-Synthese wurde jede Probe 1:2 (Ferkelversuch 1) bzw. 1:4 (Ferkelversuch 2) mit DEPC-H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

	Volumen (µl) pro Reaktionsansatz
DEPC-H ₂ O	9,95
5fach Puffer	5
dNTPs; 10 mM	1,25
Oligo-dT-18 Primer; 100 µM	1
Reverse Transkriptase RevertAid™; 200 U/µl	0,3

DEPC = Diethylpyrocarbonat; dNTPs = Desoxyribonukleosidtriphosphate

4.7.3 Quantitative *real-time* PCR

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Sequenzen gezielt amplifiziert werden. Dies geschieht mithilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und zwei zur Sequenz passenden Oligonucleotidprimern. In einem ersten Denaturierungsschritt werden die beiden DNA-Stränge der Matrize bei 95 °C getrennt. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Oligonucleotidprimer bei 55 °C. Dieser Prozess wird als Annealing bezeichnet. In einem dritten Schritt, dem Elongationsschritt, werden die Primer verlängert bis erneut eine doppelsträngige DNA vorliegt. Dieser Schritt erfolgt enzymatisch durch die thermostabile DNA-Polymerase, welche ihr Temperaturoptimum bei 72 °C hat. Die Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Produkte erfolgt mithilfe des

interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt am Ende einer jeden Elongationsphase. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur amplifizierten DNA zu. Die Detektion erfolgt somit in Echtzeit. Da die Interkalation des Farbstoffes unspezifisch erfolgt und zum Beispiel auch Primer-Dimere den Farbstoff einlagern können, wird anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierfür wird die Temperatur langsam und kontinuierlich bis auf ca. 95 °C erhöht, sodass sich die synthetisierten DNA-Stränge wieder trennen. Die Trennung erfolgt für jedes Amplifikationsprodukt bei einer spezifischen Temperatur. Der Farbstoff wird dabei wieder freigesetzt, was als eine Abnahme der Fluoreszenz detektiert wird. Die PCR wurde in der Rotorgene 2000 (Corbett Research, Australien) durchgeführt. Zu je 2 µl cDNA wurde der unten aufgeführte Mastermix (Tabelle 4) hinzu pipettiert. NTCs (*nontemplate-control*) dienten der Kontrolle. Zur Quantifizierung der Genexpression wurden C_t -Werte (*cycle threshold*) ermittelt. Initial wurden 6 Referenzgene gemessen. Deren C_t -Werte wurden quantifiziert ($2^{(\text{Primereffizienz})^{(\text{kleinster } C_t \text{ minus probenindividueller } C_t)}}$) und zur Ermittlung der drei stabilsten Referenzgene in die Software GeNorm übertragen (Tabelle 6). Des Weiteren wurden mithilfe dieser Software die Normalisierungsfaktoren gebildet, die für die Berechnung der relativen mRNA-Konzentrationen der Zielgene benötigt wurden. Die Eigenschaften aller Gene sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Mastermixes für die qPCR

Ferkelversuch	Ferkelversuch 1	Ferkelversuch 2
	Volumen (µl) pro Reaktionsansatz	Volumen (µl) pro Reaktionsansatz
DEPC-H ₂ O	7,2	2,5
KAPA TM SYBR® FAST	10	5
qPCR Mastermix		
Forward Primer (10 µM)	0,4	0,2
Reverse Primer (10 µM)	0,4	0,2

DEPC = Diethylpyrocarbonat

Tabelle 5: Eigenschaften der verwendeten Primer der Referenz- und Zielgene für die qPCR

	Primersequenz vorwärts-	- rückwärts-	Produktgröße (bp)	T _A (°C)	NCBI Gene Bank
Referenzgene					
<i>ACTB</i>	GACATCCGCAAGGACCTCTA	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	205	60	XM_003124280.3
<i>ATP5G1</i>	CAGTCACCTTGAGCCGGGCGA	TAGCGCCCCGGTGGTTTGC	94	64	NM_001025218.2
<i>GAPDH</i>	GTCGGAGTGAACGGATTG	TGGAAGATGGTGATGGCCTT	218	59	NM_001206359.1
<i>GPI</i>	CACGAGCACCGCTCTGACCT	CCACTCCGGACACGCTTGCA	365	64	NM_214330.1
<i>RPS9</i>	GTCGCAAGACTTATGTGACC	AGCTTAAAGACCTGGGTCTG	325	60	XM_003356050.1
<i>SDHA</i>	CTACGCCCCCGTCGCAAAAGG	AGTTTGCCCCCAGGCGGTG	380	64	DQ402993
Nrf2-Zielgene					
<i>GPX1</i>	GGCACAAACGGTGCGGGACTA	AGGCGAAGAGCGGGTGAGCA	235	60	NM_214201.1
<i>GSTA1</i>	CCCAGCCTGCTGGCCAACTT	TGTCCTGGGACACTCAGCCG	183	60	NM_214389.1
<i>MGST1</i>	TTGGCGCGCGAATCTACCACA	TCCTCGGCTCCCTTCCCACCTA	239	60	NM_214300.1
<i>HMOX1</i>	AGCTGTTTCTGAGCCTCCAA	CAAGACGGAAACACGAGACA	130	60	NM_001004027.1
<i>NQO1</i>	CCAGCAGCCCGGCCAATCTG	AGGTCCGACACGGCGACCTC	160	60	NM_001159613.1
<i>PRDX6</i>	GGCCGCATCCGTTTCCACGA	ACTGGATGGCAAGGTCCCGACT	280	60	NM_214408.1
<i>SOD</i>	TCCATGTCCATCAGTTTGA	CTGCCCAAGTCATCTGGTTT	250	60	NM_001190422.1
<i>TXNRD1</i>	CTTTACCTTATTGCCCGGGT	GTTCACCGATTTGTGGCC	162	60	NM_214154.3

NFκB-Zielgene

<i>CCL2</i>	CTGCACCCAGGTCCTTGC	GACCCACTTCTGCTTGGGTTTC	199	60	NM_214214.1
<i>HP</i>	GTTGCGTATCACTGCCAAAC	CAGTTTCTCTCCAGTGACCT	108	60	NM_214000.1
<i>ICAM1</i>	CGGTGGCAGCCGTGGCTATC	TTGATGCAGCCCCCGCTCGTC	208	60	NM_213816.1
<i>IL1β</i>	GTTCTCTGAGAAATGGGAGC	CTGGTCATCATCACAGAAGG	143	60	NM_214055.1
<i>IL6</i>	AAGGTGATGCCACCTCAGAC	TCTGCCAGTACCTCCTTGCT	151	60	NM_001252429.1
<i>IL8</i>	ACTTCCAAACTGGCTGTTGC	GGAATGCGTATTTATGCACTGG	120	60	NM_213867.1
<i>SAA2</i>	GCTTTCCACGGGCATCATTT	ATGTCCGAGTAGGCTCTCCA	120	60	NM_001044552.1
<i>TNF</i>	CCAAGGACTCAGATCATCGT	GCTGGTTGTCCTTTCAGCTTC	146	60	NM_214022.1

Zielgene ER-Stress

<i>ATF4</i>	AACATGGCCGAGATGAGCTTCC	TCTCCACCATCCAGTCTGTCCC	265	60	NM_001123078.1
<i>BAK1</i>	AGGACCTGAGAGATGGCGTCC	AGTCGTATCGCCGGTTGATGTC	283	63	XM_001928147.3
<i>BAX</i>	ATGGAGCTGCAGAGGATGATCG	ACGTGGGCGTCCCAAGTAG	289	60	XM_003127290.2
<i>BCL2L1</i>	CGTCCCAGCTCCACATCACC	CCTTGCTACGCTCTCCACGC	147	60	NM_214285.1
<i>CASP3</i>	CTGCCGAGGCACAGAATTG	CGCCAGGAATAGTAACCAGGTG	135	60	NM_214131.1
<i>CASP8</i>	AGAAAGATGTCCCAGGGGTGAAGA	CAGGGTGAAAGTAGGTTGTGGCA	121	60	NM_001031779.2
<i>DDIT3</i>	CTGAGTCATTGCCCTTCTCCTTCG	ACTTTGTTTCCGTTTCTCGGGTC	311	60	NM_001144845.1
<i>DNAJC3</i>	TGTCTCTCAGTGAAGTTCGTGAATG	GATTTCATATTGCTGTGTCGCATC	160	60	NM_001190184.1
<i>EDEM1</i>	TGGGTTGGAAAGCAGAGTGGC	TTCACATTGACGTAGAGTGCGCGG	200	60	XM_005669741.1

<i>FGF21</i>	CGATACCTCTACACGGATGA	CGTTGTAGCCATCCTCAAGA	262	60	NM_001163410.1
<i>HSPA5</i>	TGGAATGACCCGCTGTGC	TGGTGCAAATGTCCTTTGTTTGC	120	60	XM_001927795.5
<i>HSP90B1</i>	GCTTGTCGGTAAACTCTGG	CACATACTGGTCTAGACTAGT	196	56	NM_214103.1
<i>PDIA4</i>	CAATGACGCCAAGCGCTAC	CACCTCCGTGGCGAAGTC	178	60	NM_001267834.1
<i>PPP1R15A</i>	GGCAGTAACCAAGGGCAGACG	TTCCGGGCTCTCTAGGGACG	236	63	XM_003127275.1
<i>TP53</i>	ACTAAGCGAGCACTGCCCCAC	GTCTGGGCATCCTTCAGCTCC	155	63	NM_213824.3

Zielgene Fremdstoffmetabolismus

<i>CYP1A2</i>	TCAAAGGCTCCTGCAATTCC	AGGTTGATGGTCTTCTCCTG	159	60	NM_001159614.1
<i>CYP2E1</i>	TCTCCATCTGGAAGCACATC	TAGTGGAGCAAGACCTCCTT	220	60	NM_214421.1
<i>CYP3A29</i>	GAAATATCCTGGGCTACCGT	CTCCGGTTTGTGAAGACAGA	175	60	NM_214423.1
<i>SULT1A1</i>	GAGATTCAGAAGATCCTGGAG	TCACAGCTCAGAGCGGAAG	282	60	NM_213765.1
<i>UGT1A1</i>	GATCCTTTCCTGCAACGCAT	GGAAGGTCATGTGATCTGAG	313	60	XM_003483779.1
<i>UGT1A2</i>	CCTGCTTCTCACAGAATCCA	GTCTGTGAACAGGGCATCG	259	60	XM_003483775.1

Zielgene Fettsäuresynthese

<i>ACACA</i>	AACAAGGACCTGGTGGAGTG	CAGGAGGCTCTTCCTACGTG	256	60	NM_001114269.1
<i>FASN</i>	AGCCTAACTCCTCGCTGCAAT	TCCTTGGAACCGTCTGTGTTC	196	60	NM_001099930.1
<i>GPAT</i>	ATCGTGGCCTGCCTGCTCCT	CATAGGCTGGCGGCCTTCCG	404	64	XM_001927875.1
<i>ME1</i>	TGCCCATGAACATGAAGAAA	ATACAGGGTCTGCCCACTTG	283	60	XM_001924333.2

<i>SREBF1</i>	GCGAGTCAAGACCAGTCTC	GCTTGCTCCAAGAGGTGTTCT	267	60	NM_214157.1
PPARα- und Carnitinstoffwechselzielgene					
<i>ACOX1</i>	CTCGCAGACCCAGATGAAAT	TCCAAGCCCTCGAAGATGAGT	218	58	NM_001101028.1
<i>BBOX1</i>	GTGCCGAAAGCTCAAGGAAAAA	CTCTGCCCGGCCGTGAAGTAAC	342	60	XM_003122909.3
<i>CD36</i>	TCCTCTGACATTTGCAGGTCAATCT	GGAGATGCAAAAGCTGTGGATGG	107	59	NM_001044622.1
<i>CPT1A</i>	GCATTTGTCCCATCTTTTCGT	GCACTGGTCCTTCTGGGATA	198	60	NM_001129805.1
<i>CYP4A24</i>	GTTTGTCTCCTGTTGAATGG	GCATCACTTGGACAGACTTG	121	60	NM_214424.1
<i>FABP1</i>	ATCGTGCAGAAATGGGAAGCA	ACTGAACCACTGTCTTGACC	133	57	NM_001004046.1
<i>FGF21</i>	CGATACCTCTACACGGATGA	CGTTGTAGCCATCCTCAAGA	262	60	NM_001163410.1
<i>LPL</i>	TTCTCCCGACGACGCAGATTTT	TGCAATCACACGGATGGCTTCT	166	60	NM_214286.1
<i>SLC22A5</i>	TGACCATATCAGTGGGCTA	AGTAGGGAGACAGGATGCT	384	60	XM_003123912.2
<i>SLC25A20</i>	GCAAAGCCCATTAGCCCTCT	GAGCACATCCTCTGGGTGTT	312	60	XM_003483178.1
<i>SLC27A1</i>	GGTTCCAGCCTGTTGAATGT	AACAAAACCTTGGTGCTTGG	275	60	NM_001083931.1

Abkürzungen siehe nächste Seite

bp = Basenpaar; TA = Annealingtemperatur; ACACA = acetyl-CoA carboxylase alpha; ACOX1 = acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl; ACTB = β -actin; ATF4 = activating transcription factor 4; ATP5G1 = ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9); BAK1 = BCL2-antagonist/killer 1; BAX = BCL2-associated X protein; BBOX1 = butyrobetaine, 2-oxoglutarate dioxygenase 1; BCL2L1 = BCL2-like 1; CASP3 = caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase; CASP8 = caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase; CCL2 = chemokine (C-C motif) ligand 2; CD36 = CD36 molecule; CPT1A = carnitine palmitoyltransferase 1A; CYP1A2 = cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2; CYP2E1 = cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1; CYP3A29 = cytochrome P450 3A29; CYP4A24 = cytochrome P450 4A24; DDIT3 = DNA-damage-inducible transcript 3; DNAJC3 = DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3; EDEM1 = ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1-like; FABP1 = fatty acid binding protein 1; FASN = fatty acid synthase; FGF21 = fibroblast growth factor 21; GAPDH = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GPAT = glycerol-3-phosphate acyltransferase; GPI = glucose-6-phosphate isomerase; GPX1 = glutathione peroxidase 1; GSTA1 = glutathione S-transferase alpha 1; HMOX1 = heme oxygenase (decycling) 1; HP = haptoglobin; HSPA5 = heat shock 70kDa protein 5; HSP90B1 = heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1; IL1 β = interleukin-1 beta; IL-6 = interleukin-6; IL-8 = interleukin 8; LPL = lipoprotein lipase; ME1 = malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic; MGST1 = microsomal glutathione S-transferase 1; NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; PDIA4 = protein disulfide isomerase family A, member 4; PPP1R15A = protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A; PRDX6 = peroxiredoxin 6; RPS9 = 40S ribosomal protein S9-like; SAA2 = serum amyloid A2; SDHA = succinate dehydrogenase complex, subunit A; SLC22A5 = solute carrier family 22, member 5; SLC25A20 = solute carrier family 25, member 20; SLC27A1 = solute carrier family 27, member 1; SOD = superoxide dismutase 1, soluble; SREBF1 = sterol regulatory element binding transcription factor 1; SULT1A1 = sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1; TNF = tumor necrosis factor; TP53 = tumor protein p53; TXNRD1 = thioredoxin reductase 1; UGT1A1 = UDP-glucuronosyltransferase 1-1-like; UGT1A2 = UDP-glucuronosyltransferase 1-6-like

Tabelle 6: Durchschnittliche Expressionsstabilität der drei stabilsten Referenzgene

Ferkelversuch 1		Ferkelversuch 2	
Gen	M-Wert	Gen	M-Wert
<i>ATP5G1</i>	0,368	<i>GAPDH</i>	0,732
<i>GAPDH</i>	0,354	<i>GPI</i>	0,710
<i>RPS9</i>	0,325	<i>SDHA</i>	0,715

ATP5G1 = ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9); *GAPDH* = glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; *GPI* = glucose-6-phosphate isomerase; *RPS9* = 40S ribosomal protein S9-like; *SDHA* = succinate dehydrogenase complex, subunit A

4.7.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Produktgröße nach der qPCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Mittels 150 ml 1 x TAE-Puffer und 2,25 g Agarose wurde unter Verwendung von 4 µl GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotum, Hayward, USA) ein 1,5 %iges Gel hergestellt. Die qPCR-Produkte wurden stichprobenartig nach der Zugabe von 4 µl Green GoTaq® Flexi Buffer in die Taschen des Gels pipettiert. Als Laufpuffer fungierte der 1 x TAE-Puffer. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V. Die Detektion durch UV-Licht fand im GeneFlash (VWR, Darmstadt, Deutschland) statt.

4.7.5 Isolation von Gesamtprotein

150 mg Lebergewebe wurden mit 450 µl RIPA-Puffer und einer Homogenisierungskugel versetzt. Dem RIPA-Puffer wurde zuvor im Verhältnis 1:100 Protease Inhibitor Cocktail hinzugegeben. Das Homogenisieren erfolgte im Tissue Lyser für 4 min bei 30 Hz. Nach 60-minütiger Inkubation auf Eis bei 4 °C wurden die Proben 15 min bei 4 °C mit 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (Gesamtprotein) wurde abgenommen und bis zu den weiteren Analysen bei -80 °C gelagert.

4.7.6 Nuklearextraktion

Das Nuklearextrakt wurde mithilfe des Nuclear Extract Kit von Active Motif gewonnen. 150 mg Lebergewebe wurden mit 1 x *Hypotonic Buffer* (3 ml/g Gewebe), 3 µl/g

Dithiothreitol (DTT) und 3 µl/g Detergent versetzt. Nach Zugabe einer Homogenisierungskugel wurden die Proben im Tissue Lyser bei 25 Hz für 5 min homogenisiert. Die Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4 °C mit 3000 U/min zentrifugiert. Danach konnte der Überstand in ein neues, gekühltes Eppendorf-Tube überführt werden. Es handelte sich hierbei um einen Teil der zytoplasmatischen Fraktion. Um den Rest der zytoplasmatischen Fraktion zu gewinnen, wurde das Pellet in 500 µl 1 x *Hypotonic Buffer* resuspendiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 25 µl Detergent und vortexen, wurden die Proben 30 sec bei 4 °C mit 12.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen. Zur Gewinnung der nukleären Fraktion wurde das Pellet in 50 µl *Complete Lysis Buffer* resuspendiert, auf höchster Stufe gevortext und 30 min auf Eis auf dem Schüttler mit 150 U/min inkubiert. Bevor die Proben 10 min bei 4 °C mit 12.000 U/min zentrifugiert wurden, wurden sie 30 sec lang bei höchster Stufe gevortext. Der Überstand wurde in ein neues, gekühltes Eppendorf-Tube überführt. Die Lagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C.

4.7.7 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Bicinchoninsäure-Assay (BCA) durchgeführt. Es wurde der BC Assay Protein Quantitation Kit von Uptima verwendet. Das Prinzip des Assays beruht auf der Biuretreaktion. In alkalischer Lösung sind Proteine in der Lage zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen zu reduzieren. Diese bilden mit Bicinchoninsäure einen Farbkomplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat. Die Extinktion bei 562 nm verhält sich proportional zur vorhandenen Proteinmenge. Im Vergleich zu der Eichkurve der bovinen Serumalbumin (BSA) Standardreihe kann die Menge an vorhandenem Protein in der Probe quantifiziert werden. Die Konzentrationen der BSA-Standardreihe betrugen 0, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml. Die Proben wurden für die Messung mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Je 25 µl Standard, beziehungsweise verdünnter Probe, wurden in Dreifachbestimmung in die Kavitäten einer 96-Well-Platte pipettiert und mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt. Das Reagenz wurde zuvor aus Reagenz A (enthält Bicinchoninsäure) und B (enthält Kupfersulfat) im Mischungsverhältnis 50:1 hergestellt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 30 min. Für die Messung wurde der Plattenreader TECAN infinite M200 verwendet.

4.7.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einem diskontinuierlichen System durchgeführt. Proteingemische werden hierbei innerhalb eines elektrischen Feldes in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Gele. Die denaturierten Proteine bilden mit dem Natriumdodecylsulfat (= Sodium-Dodecyl-Sulfate = SDS) einen Komplex mit konstant negativer Ladung, sodass die Auftrennung der Proteine unabhängig von dieser ist. Die negative Ladung des Komplexes proportional zur Proteinmasse ist. Dies hat zur Folge, dass kleinere Proteine eine höhere elektrophoretische Mobilität aufweisen als größere. Die Proteine werden somit anhand ihres Molekulargewichtes separiert. Je Probe wurden 30 µg Protein eingesetzt und mit dem Puffer, in dem die Probe homogenisiert wurde, auf ein Gesamtvolumen von 15 µl gebracht. Nach Zugabe von 5 µl 4x Roti®-Load wurden die Proben für 5 min bei 95 °C im ThermoShaker denaturiert und anschließend in die Taschen der Gele appliziert. In Abhängigkeit des Zielproteins wurden Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen von 7,5 % (Phospho-PERK) oder 12,5 % (GPX1, NQO1, NF-κB p50, PERK total) verwendet. Als Marker zur Größendetektion diente eine kommerzielle Proteinleiter (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem vertikalen Mini-Elektrophoresesystem (Hoefer) in SDS-Laufpuffer bei 200 V und 20 mA im Sammelgel und anschließend bei 300 V und 36 mA im Trenngel.

Tabelle 7: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE

Volumen (µl)	Sammelgel 1,2 %	Trenngel 7,5 %	Trenngel 12,5 %
Acrylamid	150	938	1562
Sammelgelpuffer	375	-	-
Trenngelpuffer	-	1250	1250
Bidest-H ₂ O	950	2762	2138
SDS (10%)	15	50	50
APS	15	50	50
TEMED	2	2	2

Die Volumina beziehen sich jeweils auf die Zusammensetzung eines Gels. SDS-PAGE = *Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamid Gel Electrophoresis*; SDS = *Sodium-Dodecyl-Sulfate* (Natriumdodecylsulfat); APS = *Ammoniumperoxodisulfat*; TEMED = *N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin*

4.7.9 Western Blot

Nach der SDS-PAGE erfolgte die Identifizierung der Zielproteine im Western Blot. Hierfür wurde das Tank Blot System (BIO Rad Mini Trans-Blot® Cell), bestehend aus Fiberpads, Blotpapier, dem Gel und der Nitrocellulosemembran (Bio Trace™ NT), nach Herstellerangaben verwendet. Der Transfer der Proteine fand für 1,5 h bei 100 V und 300 mA in Transferpuffer statt. Die erfolgreiche Übertragung wurde mittels Ponceau S Färbung kontrolliert. Anschließend wurden freie Bindungsstellen auf den Membranen durch eine einstündige Inkubation in TBST (*tris buffered saline tween*) mit 5 % Milchpulver blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der sekundäre Antikörper für 1,5 h bei Raumtemperatur auf der Membran auf dem Wippschüttler inkubiert. Zwischen und nach den Inkubationen wurden die Membranen jeweils drei Mal für 10 min gründlich mit TBST gewaschen. Die Entwicklung der Membranen fand mithilfe des ECL-Kits (ECL Advance Western Blotting Detection Kit) statt. Für die Visualisierung der Proteinbanden auf den Membranen wurde die G:Box (Lumineszenzimager, SYNGENE) und das Programm Gene Snap (SYNGENE) verwendet. Ausgewertet wurde mit dem Programm Gene Tools (SYNGENE). Jede Membran wurde mit einem Referenzprotein inkubiert. Im Fall von PERK total und Phospho-PERK wurde α -Tubulin, für die Membranen mit GPX1, NQO1 und NF- κ B p50 wurde ACTB als Referenzprotein genutzt. Im Fall von PERK und phospho-PERK wurde aus den erhobenen Proteinkonzentrationen eine *ratio* gebildet, um den Anteil des aktiven Proteins zu ermitteln. Die Eigenschaften aller verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Eigenschaften der verwendeten Antikörper für den Western Blot

Protein	MW (kDa)	primärer AK	sekundärer AK
Referenzproteine			
ACTB	ca. 42	<i>mouse monoclonal anti</i> β -Actin (ab6276) V: 1:5000	<i>anti-mouse IgG-HRP</i> (ab6728) V: 1:10.000
α -Tubulin	ca. 52	<i>rabbit polyclonal anti</i> α - Tubulin (11H10) V: 1:1000	<i>anti-rabbit IgG-HRP</i> (sc-2004) V: 1:10.000
Nrf2-Zielproteine			
GPX1	ca. 22	<i>rabbit polyclonal anti</i> GPX1 (ab22604) V: 1:10.000	<i>anti-rabbit IgG-HRP</i> (sc-2004) V: 1:10.000
NQO1	ca. 31	<i>goat polyclonal anti</i> NQO1 (C-19) (sc-16464) V: 1:1000	<i>anti-goat IgG-HRP</i> (sc2020) V: 1:10.000
NF-κB-Zielprotein			
NF- κ B p50	ca. 50	<i>rabbit polyclonal anti</i> NF- κ B p50 (H-119) (sc-7178) V: 1:200	<i>anti-rabbit IgG-HRP</i> (sc-2004) V: 1:10.000
Zielproteine ER-Stress			
PERK total	ca. 125	<i>goat polyclonal anti</i> PERK (T-19) (sc-9477) V: 1:1000	<i>anti-goat IgG-HRP</i> (sc2020) V: 1:10.000
phospho-PERK	ca. 170	<i>rabbit polyclonal anti</i> phospho-PERK (Thr980) (16F8) V: 1:1000	<i>anti-rabbit IgG-HRP</i> (sc- 2004) V: 1:10.000

ab = Abcam, Cambridge, England; ACTB = β -actin; GPX1 = *glutathione peroxidase 1*; NF- κ B p50 = *nuclear factor kappa light chain enhancer in B cells p50*; NQO1 = *NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1*; PERK = *protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*; sc = Santa Cruz Biotechnology, Inc. Deutschland; V = Verdünnung

4.7.10 Bestimmung von Retinol und Tocopherolen

Retinol- und Tocopherolgehalte in Plasma und Leber wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) bestimmt. Zunächst wurde das Probenmaterial in einem Ethanol/Pyrogallol-Gemisch (EOH/Pyro) und NaOH für 30 min bei 70 °C im Thermoblock verseift. Das Abkühlen der Proben fand im Dunklen statt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Vitamine durch die Zugabe von Hexan und bidestilliertem Wasser. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 10 °C mit 3500 U/min wurde die Hexanphase in ein neues Reagenzgefäß überführt und unter Stickstoffatmosphäre bei -20 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt. Die jeweiligen Volumina der Reagenzien bei diesen Arbeitsschritten für die Aufarbeitung der Plasma- und Leberproben sind in Tabelle 9 dargestellt. Für die HPLC-Analyse wurde der adäquate Teil aus der oberen Hexanphase abgenommen und mittels Stickstoff abgedampft. Vor der Injektion in die HPLC wurden die Proben in der entsprechenden Menge Methanol/BHT in einem Microvial aufgenommen.

Tabelle 9: Volumina der Reagenzien für die HPLC zur Bestimmung der Retinol- und Tocopherolgehalte in Plasma und Leber

	Plasma	Leber
Einwaage (ml bzw. g)	0,2	0,1
Zugabe EOH/Pyro (ml)	1	2
Zugabe NaOH (µl)	150	300
Zugabe Hexan (ml)	2	2
Zugabe H ₂ O _{bidest} (ml)	2	2
Abnahme Hexan (ml)	0,5	0,5
Aufnahme MeOH/BHT (ml)	0,25	0,35
Verdünnung (abhängig von Vit. E-Gehalt)	1,0	1,4

EOH/Pyro = Ethanol/Pyrogallol-Gemisch; MeOH/BHT = Methanol/Butylhydroxytoluol; NaOH = Natriumhydroxid

Die HPLC-Analyse erfolgte mit einem LaChrom Elite® HPLC-System mit Fluorescence-Detektion. Ausnahme bildete die Retinolmessung in der Leber. Aufgrund hoher Konzentrationen wurde hier für die Auswertung eine UV-Detektion verwendet. Die HPLC-Bedingungen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Als Fließmittel wurde Methanol genutzt. Die Fließgeschwindigkeit wurde mit 1,3 ml/min vorgegeben.

Verwendet wurde ein Injektionsvolumen von 50 µl unter einem Druck von 53 bar und einer Temperatur des Säulenofens von 40 °C. Die Analysezeit betrug 7,5 min. Für die Kalibration wurden Eichkurven mit bekannten Konzentrationen der Standards in verschiedenen Verdünnungsstufen angefertigt. Die Konzentrationen lagen hierbei beim Retinol im Bereich von 0,03 – 0,6 µg/ml (Plasma) bzw. 0,03 – 7,5 µg/ml (Leber). Beim γ-Tocopherol lag der Bereich zwischen 0,004 – 0,09 µg/ml und beim α-Tocopherol zwischen 0,06 – 1,3 µg/ml. Anhand der Retentionszeiten konnten die Chromatogramme den entsprechenden Vitaminen zugeordnet werden. So wies Retinol eine Retentionszeit von 2,2 min auf. Bei γ-Tocopherol hingegen betrug diese 4,4 min; bei α-Tocopherol 5 min. Abbildung 9 zeigt beispielhafte Chromatogramme.

Tabelle 10: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Retinol- und Tocopherolgehalte in Plasma und Leber

Pumpe	L-7100 (LaChrom)
Säulenofen	L-7360 (LaChrom)
Autosampler	L-7200 (LaChrom)
Detektor (Tocopherol, Retinol Plasma)	Fluorescence Detector L-7485 (LaChrom)
Einstellungen Fluorescence-Detektor	0 – 3,3 min: Vitamin A = EM 475 nm; EX 325 nm 3,3 – 7,3 min: Vitamin E = EM 325 nm; EX 295 nm
Detektor (Retinol Leber)	UV-Detektor L7400 (LaChrom)
Einstellungen UV-Detektor	0 – 3,5 min: Vitamin A = EM 325 nm 3,6 – 7,4 min: Vitamin E = EM 295 nm
Säule	Phenomenex Luna 5u C18(2); 150*4,6mm (S/No 681886-19)
Vorsäule	Phenomenex

EM = Emissionswellenlänge; EX = Anregungswellenlänge (*excitation wavelength*)

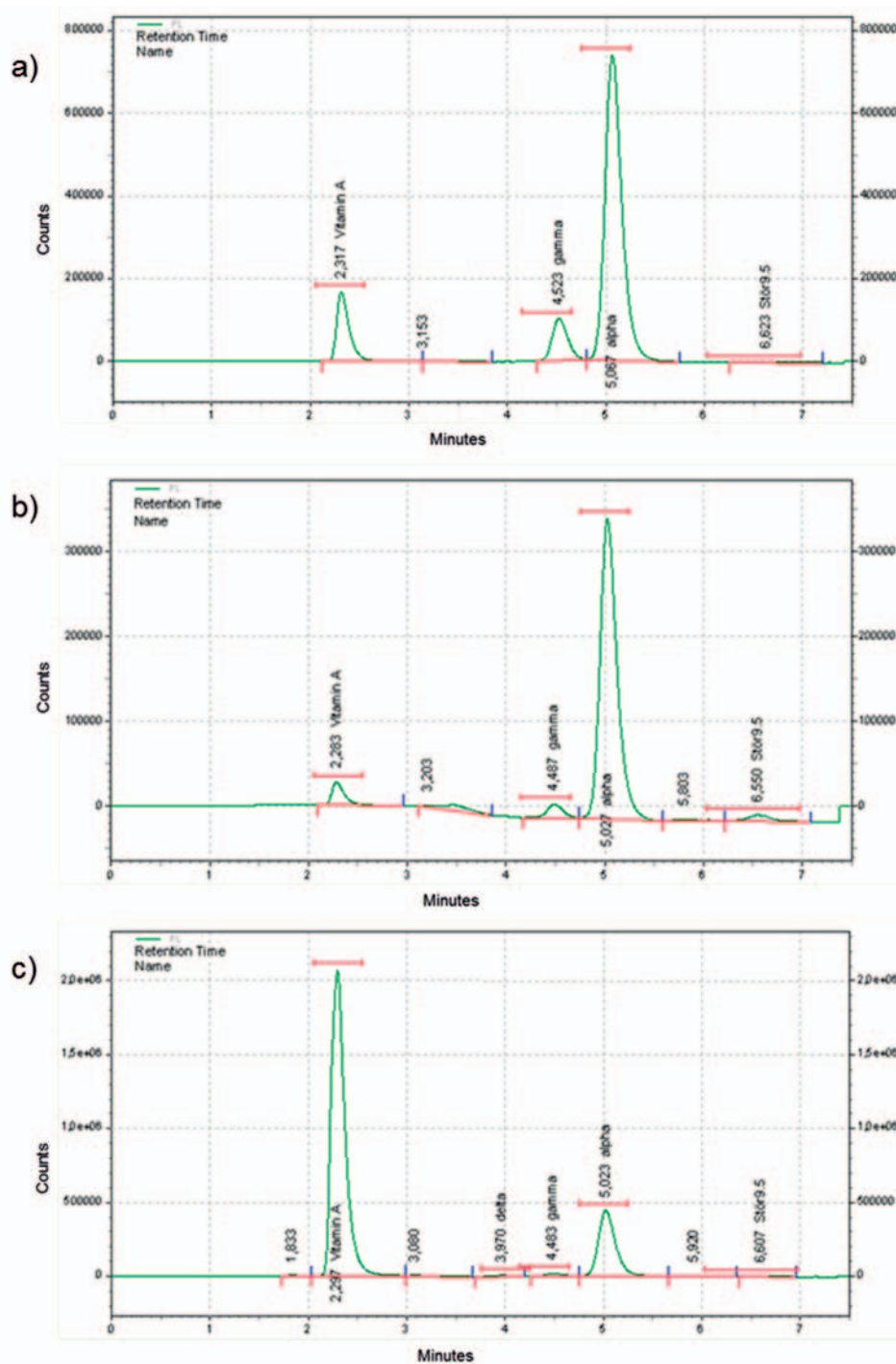


Abbildung 9: Beispielhafte HPLC-Chromatogramme der Vitamin A und E Bestimmungen
a) Standard; b) Plasmaprobe, Gruppe Traubentrester; c) Leberprobe, Gruppe Hopfen

Vitamin A: Peak bei einer Retentionszeit von ca. 2,3 min; Vitamin E: Peak des alpha-Tocopherols bei einer Retentionszeit von ca. 5 min und des gamma-Tocopherols bei ca. 4,5 min; delta-Tocopherol ist aufgrund der sehr geringen Konzentrationen zu vernachlässigen.

Ausgewertet wurde mithilfe der Eichkurve und der Software EZChrom Elite Version 3.3.1. Die Quantifizierung der Konzentrationen erfolgte anhand linearer Regression über die Peakflächen unter Einbeziehung des Volumens und der Verdünnung. Das Gesamtvitamin E wurde als Addition aus dem α - und γ -Tocopherol berechnet. Zuvor wurde die γ -Tocopherolkonzentration mit dem Umrechnungsfaktor 0,25 multipliziert.

̈-Tocopherol wurde nicht berücksichtigt, da die Peakflächen teilweise so klein waren, dass eine Konzentrationsbestimmung nicht möglich war.

4.7.11 Bestimmung von Triglyceriden

Die Triglyceride wurden mit dem Fluitest TG® (Analyticon® Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) in Plasma und Leber bestimmt. Bei der Methode des enzymatischen Farbttests werden Triglyceride mittels mikrosomaler Lipoproteinlipase zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Bei der anschließenden Oxidation von Glycerin entsteht Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid bildet durch eine von Peroxidase katalysierte Endpunktreaktion nach Trinder einen roten Farbstoff, welcher sich proportional zur Triglyceridkonzentration verhält. Im ersten Schritt wurden die Lipide aus dem Lebergewebe extrahiert. Dafür wurden 50 mg Lebergewebe mit 500 µl Hexan:Isopropanol (3:2, v/v) im Tissue Lyser für sechs Minuten bei 20 Hz homogenisiert. Hexan/Isopropanol dient als organisches Lösungsmittel, das die Lipide von polarerer Verbindungen wie z.B. Proteinen oder Kohlenhydraten abtrennt. Nach 30-minütiger Inkubation im Ultraschallbad wurden die Proben 10 min bei 15 °C mit 4500 U/min zentrifugiert. Der Überstand, das Lipidextrakt, wurde abgenommen und dann im Thermoblock auf eine Temperatur von 25 °C gebracht. Nach dem Abdampfen mit Stickstoff bei 37 °C, wurden die Proben in Isopropanol aufgenommen. Die Plasmaproben wurden ebenfalls im Thermoblock auf 25 °C gebracht und nach kräftigem vortexen nochmals eine halbe Stunde inkubiert. Nach Zusatz des Testreagens wurden die Triglyceride bestimmt. Die Messung erfolgte photometrisch bei 500 nm. Hierfür wurde das Varian Cary 50 Bio UV-Visible Spectrophotometer (Ferkelversuch 1) bzw. der Plattenreader TECAN infinite M200 (Ferkelversuch 2) verwendet. Zur Qualitätsverifizierung und Quantifizierung wurden Standards, Blindwerte und bei den Plasmaproben das Kontrollserum Contronorm® bei allen Messungen mitgeführt.

4.7.12 Bestimmung des antioxidativen Status

4.7.12.1 Herstellung des Leberhomogenats

Für die Homogenatherstellung wurden 50 mg Lebergewebe mit 500 µl 1 x TBA-Puffer versetzt und anschließend bei 20 Hz für 6 min im Tissue Lyser (Qiagen GmbH,

Deutschland) homogenisiert. Nach Begasung mit Stickstoff wurden die Homogenate 10 min bei 2 °C mit 2300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und vor dem Einfrieren bei -80 °C nochmals mit Stickstoff begast. Die Homogenate wurden maximal zwei Tage für die Messungen aufbewahrt.

4.7.12.2 Trolox Equivalent Antioxidative Capacity

Die TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) wurde im Plasma und im Leberhomogenat nach der Methode von Re et al. (1999) ermittelt. Das Prinzip beruht auf der photometrischen Messung der Absorptionsänderung des Radikalkations ABTS^{•+} (2,2'-Azino-di- [3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat]) bei 734 nm. Die Entfärbung des blaugrünen ABTS^{•+} basiert auf einer Reduktion des Radikalkations durch die in der Probe enthaltenen Antioxidantien. Dies geschieht proportional zu ihrer Konzentration. Bezogen wird die Messung auf die antioxidative Aktivität einer 1 mM Lösung der Referenzsubstanz Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat. Zunächst wurde das Radikalkation ABTS^{•+} hergestellt. Hierfür wurde eine 14 mM ABTS[®]-Stammlösung mit einer 4,9 mM Kaliumperoxidisulfatlösung für 24 h inkubiert. Diese wurde dann 1:90 mit H₂O_{bidest} verdünnt, um bei 734 nm eine Absorption von $0,7 \pm 0,02$ zu erreichen. Als Standard wurde eine 1 mM Trolox-Stammlösung eingesetzt, aus der für die Eichkurve sechs Standards mit den Konzentrationen 750, 500, 250, 100, 50 und 0 µM durch verdünnen mit einem H₂O_{bidest}/Ethanol-Gemisch (75:25/v:v) hergestellt wurden. Die Plasmaproben und die Leberhomogenate wurden jeweils 1:10 mit H₂O_{bidest} verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der Standards und 10 µl der verdünnten Proben in eine 96-Well-Platte pipettiert. Zur Qualitätskontrolle erfolgte eine Doppelbestimmung der Standards und eine Dreifachbestimmung der Proben. Durch die Zugabe von 300 µl ABTS[®]-Radikallösung wurde die Reaktion gestartet. Danach erfolgte eine sechsminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Für die Absorptionsmessung wurde der Plattenreader TECAN infinite M200 verwendet. Die Berechnung der antioxidativen Kapazität erfolgte mit Trolox als Referenz (Betancor-Fernandez et al. 2002).

4.7.12.3 Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen

Die Messung der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARS) wurde nach der Methode von (Sidwell et al. 1954) durchgeführt. Bei Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen handelt es sich um Carbonylverbindungen wie Aldehyde und Ketone, die bei der Lipidperoxidation entstehen. Wichtigster Vertreter ist hierbei das Malondialdehyd als Abbauprodukt der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Im sauren Milieu bildet Thiobarbitursäure mit diesen Verbindungen einen Farbkomplex. Als Standard wurde 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) verwendet. Die Messung erfolgte in Plasma und Leber. Für die Eichkurve wurden sechs TEP-Standards mit den Konzentrationen 0,60, 1,20, 2,41, 4,81, 7,22 und 12,03 μM durch verdünnen mit einem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ /Ethanol-Gemisch (58:42/v:v) hergestellt. In ein Reagenzröhrchen wurden 50 μl Standard, 200 μl Plasma, 50 μl Leberhomogenat oder 50 μl des $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ /Ethanol-Gemisches (Blindwert) pipettiert und mit 750 μl 0,44 M *ortho*-Phosphorsäure und 250 μl 0,6 %iger Thiobarbitursäure (TBA) versetzt. Dieser Reagenzansatz wurde dann mithilfe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml gebracht. Nach Verschluss der Reagenzröhrchen erfolgte eine 60-minütige Inkubation im Thermoblock bei 100 °C. Anschließend wurden die Ansätze sofort in Eis abgekühlt und dann mit 1,5 ml methanolischer Natronlauge versetzt. Mittels Kühlzentrifuge (Heraeus Variofuge K) wurden die Proben 10 min bei 10 °C mit 4000 U/min zentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden in eine Fluoreszenzküvette überführt und im Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer LS 55) bei einer Extinktionswellenlänge von 532 nm und einer Emissionswellenlänge von 553 nm gemessen. Die Messung der Standards und des Blindwertes erfolgte in Doppelbestimmung. Die Proben wurden in Dreifachbestimmung gemessen. Die Konzentrationen wurden anhand der TEP-Standardkurve berechnet.

4.8 Statistische Auswertung

Die Auswertungen der beiden Ferkelversuche unterschieden sich aufgrund der unterschiedlichen Versuchsmodelle.

4.8.1 Statistische Auswertung der Daten aus dem Ferkelversuch 1

Für die statistische Auswertung des ersten Ferkelversuchs wurde das Programm MiniTab verwendet (Version 13, Minitab Inc., State College, PA, USA). Die erhobenen Daten wurden zunächst mithilfe des Anderson-Darling-Tests auf Normalverteilung getestet. Ausreißer wurden durch Cook-Distanzen identifiziert und eliminiert. Als Grenzwert wurde eine Cook-Distanz größer $4/n$ definiert. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden die Daten einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Als multipler Mittelwertvergleich diente der Fisher-Test. Nicht normalverteilte Daten wurden mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests analysiert. Anschließend wurde bei den nicht normalverteilten Daten der Mann-Whitney-Test als multipler Mittelwertvergleich eingesetzt. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgesetzt ($P < 0,05$). Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (SD).

4.8.2 Statistische Auswertung der Daten aus dem Ferkelversuch 2

Auch die Datensätze des zweiten Ferkelversuchs wurden mithilfe des Statistikprogramms MiniTab auf Normalverteilung (Anderson-Darling-Test) getestet und von Ausreißern über Cook-Distanzen bereinigt. Der Grenzwert lag bei einer Cook-Distanz größer $4/n$. Für die anschließende Statistik wurde die freie Software R (Version 3.1.1 „*Sock it to me*“, R Development Core Team, The R Foundation, Wien, Österreich) verwendet. Die Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA; Faktoren: Behandlung, Zeit, Behandlung x Zeit) und dem multiplen Mittelwertvergleich nach Hochberg. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % festgesetzt ($P < 0,05$). Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichungen (SD).

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse aus Ferkelversuch 1

5.1.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Leistungsparameter von Ferkeln

Durch das Rückwiegen von Futter und tägliches Wiegen der Ferkel konnte überprüft werden, ob polyphenolhaltige Futterkomponenten die Leistungsdaten der abgesetzten Ferkel beeinflussen (Tabelle 11). Die Daten wurden bereits in einer Originalpublikation veröffentlicht (Fiesel et al. 2014). Beim Anfangsgewicht, Endgewicht, der täglichen Futteraufnahme und der täglichen Gewichtszunahme zeigten sich keine Gruppenunterschiede. Das Verhältnis von der Gewichtszunahme in Gramm pro Kilogramm Futterverbrauch (*gain:feed ratio*) war bei den Tieren, die Hopfen als Polyphenolquelle erhielten, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert ($P < 0,05$). In der Tendenz ($P < 0,10$) beeinflusste auch Traubentrester die Futterverwertung im Vergleich zur Kontrollgruppe positiv.

Tabelle 11: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Leistungsparameter beim Ferkel

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
Anfangsgewicht (kg)¹	9,8 ± 0,5	10,0 ± 0,5	9,9 ± 0,6
Endgewicht (kg)¹	23,7 ± 2,6	24,1 ± 2,1	23,4 ± 2,0
tgl. Futteraufnahme (g)²	828 ± 115	789 ± 85	762 ± 53
tgl. Gewichtszunahme (g)¹	497 ± 63	509 ± 74	497 ± 77
<i>gain:feed ratio</i> (g/kg)²	579 ± 68	620 ± 53 [#]	638 ± 83 [*]

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; ¹n = 16/Gruppe; ²n = 8/Gruppe; * $P < 0,05$; # $P < 0,10$. tgl. = tägliche.

5.1.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Signalwege der Stressantwort in der Leber beim Ferkel

Der Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf Signalwege der Stressantwort in der Leber wurde auf Genexpressions- und Proteinebene untersucht. Ausgewählte Ergebnisse dieser Analysen wurden bereits publiziert (Gessner et al. 2016).

5.1.2.1 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den Nrf2-Signalweg in der Leber beim Ferkel

Um den Einfluss polyphenolhaltiger Futterkomponenten auf den Signalweg des Nrf2 zu überprüfen, wurden auf Genexpressionsebene die relativen mRNA-Konzentrationen von acht Nrf2 Zielgenen im Lebergewebe bestimmt. Ausgewählte Gene waren die Glutathionperoxidase (GPX1), die Glutathion-S-Transferase alpha 1 (GSTA1), die mikrosomale Glutathion-S-Transferase (MGST1), die Hämoxigenase (HMOX1), die NADPH-Dehydrogenase (NQO1), das Peroxiredoxin (PRDX6), die Superoxiddismutase (SOD) und die Thioredoxinreduktase (TXNR1). Die Genexpression der Nrf2-Zielgene wurde durch den Zusatz der polyphenolhaltigen Futterkomponenten im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum beeinflusst. Lediglich bei der HMOX1 wurde die relative mRNA-Konzentration durch den Einsatz von Hopfen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht ($P < 0,05$). Bei einem Gen, der SOD, trat ein tendenzieller Unterschied zwischen der Traubentrester- und der Kontrollgruppe auf. Die relative mRNA-Konzentration in der Traubentrestergruppe war bei diesem Gen im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell erniedrigt ($P < 0,10$). Die relativen mRNA-Konzentrationen der einzelnen Nrf2-Zielgene sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Des Weiteren wurden die Expressionen von Genen bestimmt, die für Enzyme der Phase I und II des xenobiotischen Leberstoffwechsels kodieren und die durch den Nrf2 reguliert werden. Dies waren Cytochrom P450 Enzyme (CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A29) (Phase I), eine Sulfotransferase (SULT1A1) und UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT1A1 und UGT1A2) (Phase II). Wie der Tabelle 13 zu entnehmen ist, trat nur bei einem Gen, CYP1A2, eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration der Hopfengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf ($P < 0,05$).

Tabelle 12: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Nrf2-Zielgenen in der Leber

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
GPX1	1,00 ± 0,22	0,93 ± 0,16	1,07 ± 0,22
GSTA1	1,00 ± 0,28	0,85 ± 0,19	0,98 ± 0,21
MGST1	1,00 ± 0,21	0,91 ± 0,21	1,02 ± 0,23
HMOX1	1,00 ± 0,32	0,95 ± 0,20	1,26 ± 0,33*
NQO1	1,00 ± 0,32	0,93 ± 0,35	0,91 ± 0,32
PRDX6	1,00 ± 0,29	0,91 ± 0,29	1,05 ± 0,33
SOD	1,00 ± 0,18	0,85 ± 0,21 [#]	0,98 ± 0,20
TXNRD1	1,00 ± 0,18	1,01 ± 0,28	1,07 ± 0,21

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 16/Gruppe; * P < 0,05; [#] P < 0,10. GPX1 = glutathione peroxidase 1; GSTA1 = glutathione S-transferase alpha 1; MGST1 = microsomal glutathione S-transferase 1; HMOX1 = heme oxygenase (decycling) 1; NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; PRDX6 = peroxiredoxin 6; SOD = superoxide dismutase 1, soluble; TXNRD1 = thioredoxin reductase 1.

Tabelle 11: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Zielgenen des Fremdstoffmetabolismus in der Leber

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
CYP1A2	1,00 ± 0,26	0,96 ± 0,27	1,33 ± 0,43*
CYP2E1	1,00 ± 0,26	0,93 ± 0,22	1,17 ± 0,27
CYP3A29	1,00 ± 0,33	0,89 ± 0,32	1,08 ± 0,36
SULT1A1	1,00 ± 0,33	0,96 ± 0,32	1,07 ± 0,37
UGT1A1	1,00 ± 0,36	0,92 ± 0,26	1,24 ± 0,41
UGT1A2	1,00 ± 0,30	1,00 ± 0,26	0,98 ± 0,26

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 16/Gruppe; * P < 0,05. CYP1A2 = cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2; CYP2E1 = cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1; CYP3A29 = cytochrome P450 family 3 subfamily A member 29; SULT1A1 = sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1; UGT1A1 = UDP-glucuronosyltransferase 1-1-like; UGT1A2 = UDP-glucuronosyltransferase 1-6-like.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden auf Proteinebene validiert. Hierfür wurde die relative Proteinkonzentration von NQO1 im Western Blot bestimmt. Zwischen den Gruppen wurde kein Unterschied der NQO1-Proteinkonzentration festgestellt.

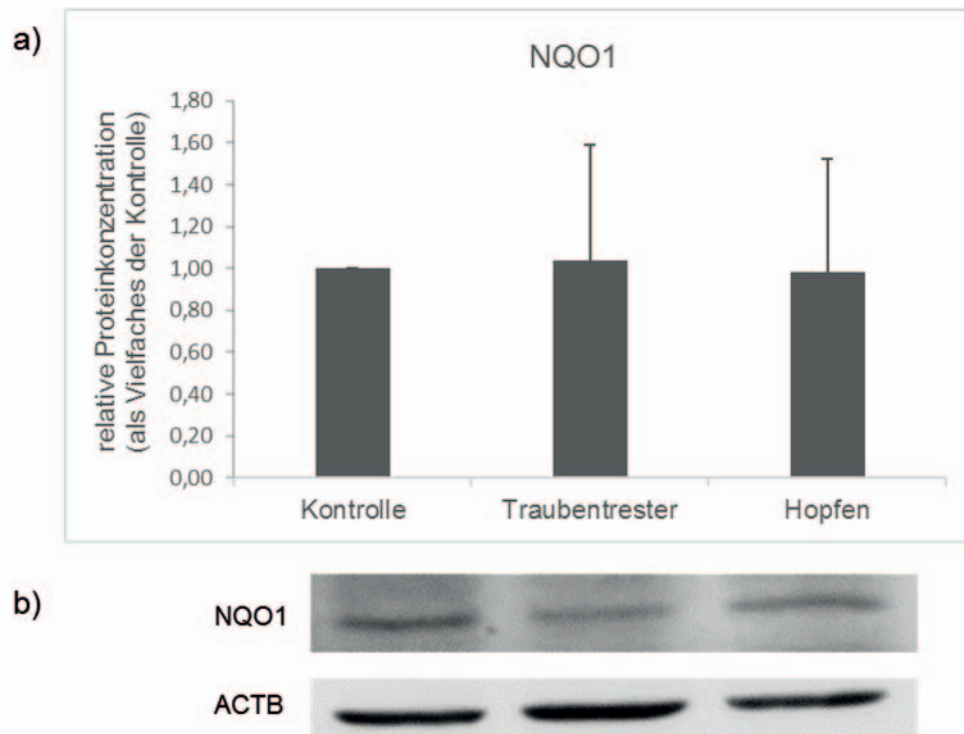


Abbildung 10: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relative Proteinkonzentration der NQO1 im Gesamtprotein der Leber

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; $n = 8/\text{Gruppe}$; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins ACTB; b) repräsentativer Blot der NQO1 und des ACTB. ACTB = β -Actin; NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1.

Weiterhin wurden die Retinolgehalte in Plasma und Leber als ein Indikator der Leberfunktion bestimmt. Polyphenolreiche Futterkomponenten beeinflussten diese nicht. So wurden im Plasma Konzentrationen von $1,08 \pm 0,14$ (Kontrolle), $1,01 \pm 0,17$ (Traubentrester) und $1,05 \pm 0,14$ (Hopfen) $\mu\text{mol/l}$ Retinol ermittelt. In der Leber beliefen sich die Retinolgehalte auf 215 ± 40 (Kontrolle), 202 ± 42 (Traubentrester) und 211 ± 36 (Hopfen) nmol/g .

5.1.2.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den NF-κB-Signalweg in der Leber beim Ferkel

Gemessene NF-κB-Zielgene waren vier proinflammatorische Zytokine (TNF, IL1β, IL6, IL8), zwei akute Phase Proteine (HPgl, SAA2), ein Chemokin (CCL2) und ein interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM1). Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt. Es trat lediglich bei einem Gen, dem IL8, ein signifikanter Konzentrationsunterschied in der Höhe der ermittelten relativen mRNA zwischen den Gruppen auf. Diese war eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration von IL8 ($P < 0,05$) in der Traubentrestergruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Zusatz von Hopfen führte bei HPgl und SAA2 zu einer tendenziellen Steigerung der relativen mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle ($P < 0,10$).

Tabelle 14: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten NF-κB-Zielgenen in der Leber

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
CCL2	1,00 ± 0,29	1,01 ± 0,38	1,21 ± 0,48
HP	1,00 ± 0,20	1,03 ± 0,25	1,20 ± 0,28 [#]
ICAM1	1,00 ± 0,21	0,94 ± 0,22	0,98 ± 0,26
IL1β	1,00 ± 0,92	0,85 ± 0,54	0,92 ± 1,12
IL6	1,00 ± 0,35	1,11 ± 0,47	1,16 ± 0,38
IL8	1,00 ± 0,38	1,44 ± 0,59 [*]	1,11 ± 0,51
SAA2	1,00 ± 0,56	1,27 ± 0,67	1,62 ± 0,93 [#]
TNF	1,00 ± 0,31	1,02 ± 0,26	1,19 ± 0,41

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 16/Gruppe; * $P < 0,05$; # $P < 0,10$. CCL2 = chemokine (C-C motif) ligand 2; HP = haptoglobin; ICAM1 = intercellular adhesion molecule-1; IL1β = interleukin 1 beta; IL6 = interleukin 6; IL8 = interleukin 8; SAA2 = serum amyloid A2; TNF = tumor necrosis factor.

Mit Hilfe einer Western Blot Analyse wurde die relative Proteinkonzentration von NF- κ B p50 bestimmt. Diese wurde durch den Einsatz polyphenolhaltiger Futterkomponenten nicht beeinflusst.

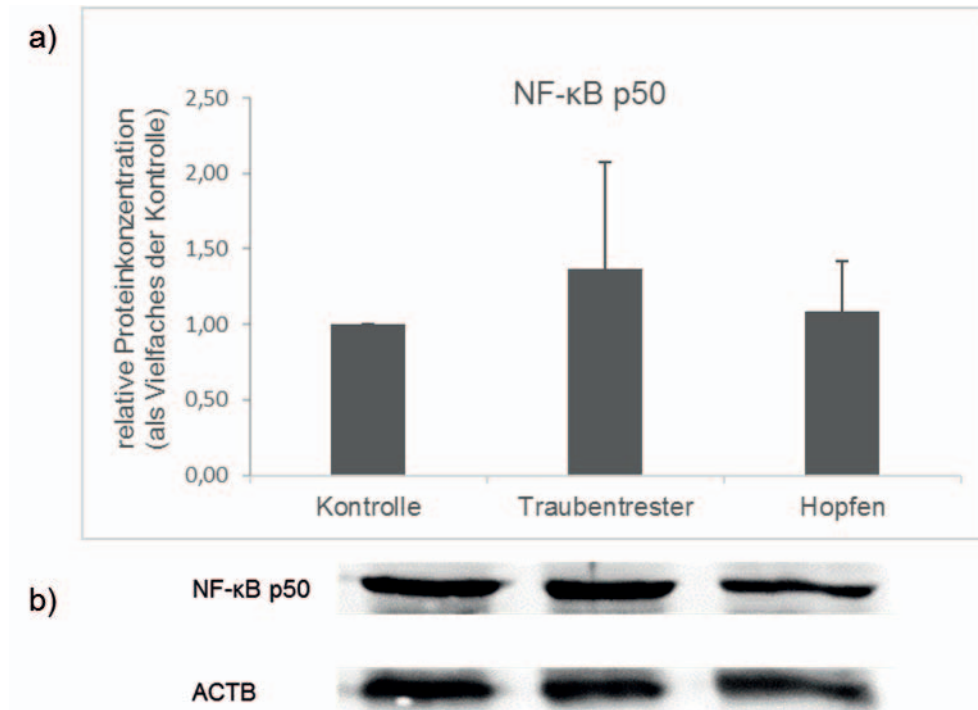


Abbildung 11: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relative Proteinkonzentration von NF- κ B p50 im Nuklearprotein der Leber

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 8/Gruppe; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins ACTB; b) repräsentativer Blot des NF- κ B p50 und des ACTB. ACTB = β -Actin; NF- κ B p50 = nuclear factor kappa B, p50.

5.1.2.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die UPR in der Leber beim Ferkel

Die UPR infolge von ER-Stress wurde auf Genexpressionsebene durch die Bestimmung der relativen mRNA-Konzentrationen von 15 Zielgenen untersucht. So wurden die mRNA-Konzentrationen der Chaperone HSPA5, HSP90B1 und DNAJC3 und die mRNA-Konzentration der Proteindisulfidisomerase PDIA4 ermittelt. Des Weiteren wurden die mRNA-Konzentrationen von EDEM1 und ATF4 gemessen. EDEM1 kann der ER assoziierten Degradation (ERAD) zugeordnet werden. ATF4 gehört dem PERK-Signalweg an. Die relativen mRNA-Konzentrationen einer Reihe von Genen, die regulierend in die Apoptose eingreifen, wurden ebenfalls ermittelt. Dazu zählen BAK1, BAX, BCL2L1, CASP3, CASP8, PPP1R15A, TP53 und DDIT3. FGF21 ist der Ketogenese zuzuordnen und ist sowohl ER-Stress-Zielgen als auch PPAR α -Zielgen. Die Abkürzungen und relativen mRNA-Konzentrationen sind der nachstehenden Tabelle 15 zu entnehmen. Beim Vergleich des Hopfenzusatzes mit der Kontrollgruppe konnten bei zwei Genen, BAK1 und PDIA4, signifikant erhöhte relative mRNA-Konzentrationen festgestellt werden ($P < 0,05$). Die Expressionen der UPR-Gene wurden durch den Zusatz von Traubentrester wenig effektiert. Die einzige signifikante Steigerung der relativen mRNA-Konzentration wurde bei PDIA4 beobachtet ($P < 0,05$). Bei CASP8 war die Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe durch den Einsatz von Traubentrester hingegen tendenziell verringert ($P < 0,10$).

Tabelle 15: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten UPR-Zielgenen in der Leber

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
<i>ATF4</i>	1,00 ± 0,22	0,87 ± 0,19	1,01 ± 0,22
<i>BAK1</i>	1,00 ± 0,28	1,06 ± 0,27	1,26 ± 0,30*
<i>BAX</i>	1,00 ± 0,26	1,00 ± 0,27	1,20 ± 0,36
<i>BCL2L1</i>	1,00 ± 0,28	0,92 ± 0,19	1,14 ± 0,30
<i>CASP3</i>	1,00 ± 0,16	1,04 ± 0,17	1,07 ± 0,22
<i>CASP8</i>	1,00 ± 0,19	0,85 ± 0,18 [#]	0,88 ± 0,19
<i>DDIT3</i>	1,00 ± 0,14	1,02 ± 0,21	0,88 ± 0,12
<i>DNAJC3</i>	1,00 ± 0,19	1,01 ± 0,18	1,07 ± 0,25
<i>EDEM1</i>	1,00 ± 0,19	0,99 ± 0,16	1,14 ± 0,23
<i>FGF21</i>	1,00 ± 1,21	1,26 ± 1,67	0,75 ± 1,16
<i>HSPA5</i>	1,00 ± 0,30	1,03 ± 0,26	1,06 ± 0,37
<i>HSP90B1</i>	1,00 ± 0,25	1,02 ± 0,23	1,07 ± 0,23
<i>PDIA4</i>	1,00 ± 0,17	1,24 ± 0,26*	1,59 ± 0,29*
<i>PPP1R15A</i>	1,00 ± 0,31	1,09 ± 0,32	1,08 ± 0,42
<i>TP53</i>	1,00 ± 0,36	0,92 ± 0,19	0,95 ± 0,28

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 16/Gruppe; * P < 0,05; # P < 0,10. *ATF4* = activating transcription factor 4; *BAK1* = BCL2-antagonist/killer 1; *BAX* = BCL2-associated X protein; *BCL2L1* = BCL2-like 1; *CASP3* = caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase; *CASP8* = caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase; *DDIT3* = DNA-damage-inducible transcript 3; *DNAJC3* = DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3; *EDEM1* = ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1-like; *FGF21* = fibroblast growth factor 21; *HSPA5* = heat shock 70kDa protein 5; *HSP90B1* = heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1; *PDIA4* = protein disulfide isomerase family A, member 4; *PPP1R15A* = protein phosphatase 1, regulatory subunit 15A; *TP53* = tumor protein 53.

Zur Untersuchung der UPR infolge von ER-Stress auf Proteinebene wurden die relativen Proteinkonzentrationen von PERK und phosphoryliertem PERK gemessen. Die erhobenen Konzentrationen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht.

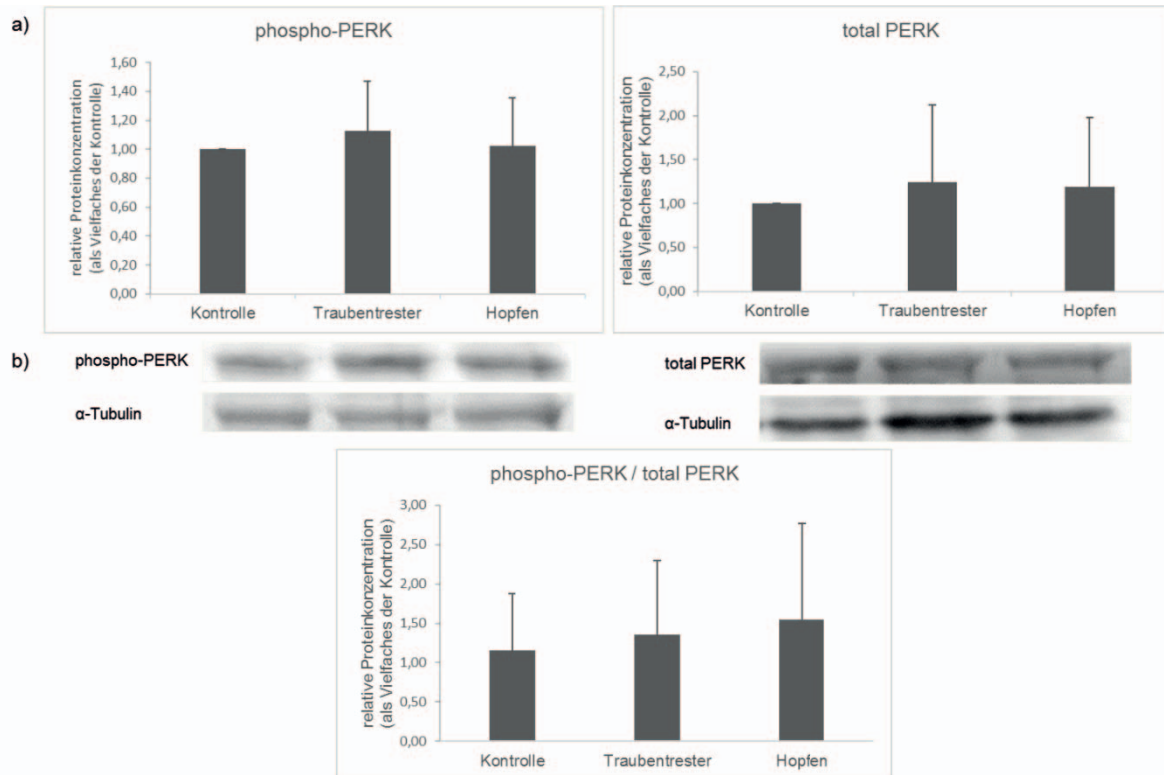


Abbildung 12: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf die relativen Proteinkonzentrationen von total PERK und phospho-PERK im Gesamtprotein der Leber

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; $n = 8$ /Gruppe; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins α -Tubulin; b) repräsentativer Blot des total PERK, phospho-PERK und der dazugehörigen α -Tubuline. *PERK* = *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*.

Es wurden Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma bestimmt. Die Konzentrationen betrugen im Plasma $0,43 \pm 0,11$ (Kontrolle), $0,40 \pm 0,09$ (Traubentrester) und $0,36 \pm 0,09$ (Hopfen) mmol Triglyceride pro l. In der Leber lagen die Konzentrationen der Triglyceride bei $3,57 \pm 0,62$ (Kontrolle), $3,60 \pm 0,62$ (Traubentrester) und $3,32 \pm 0,69$ (Hopfen) μ mol/g. Die statistische Auswertung der Daten ergab keine Gruppenunterschiede.

5.1.3 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf antioxidative Parameter in Plasma und Leber beim Ferkel

An Parametern des antioxidative Status der Ferkel wurden die Vitamin E Gehalte (α - und γ -Tocopherol) und die TEAC bestimmt. Über die Messung der TBARS wurden Oxidationsprodukte erfasst. Die Analysen wurden in Plasma- und Leberproben durchgeführt. Wie die Tabelle 16 zeigt wurden keine Konzentrationsunterschiede zwischen der Kontroll- und den Behandlungsgruppen in all diesen Messparametern festgestellt. Einzige Ausnahme bildete der γ -Tocopherolgehalt im Plasma. Dieser wurde durch den Futterzusatz von 1 % Traubentrester im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigert. Allerdings spielt γ -Tocopherol im Vergleich zu α -Tocopherol mengenmäßig eine untergeordnete Rolle am Vitamin E Gesamtgehalt, sodass dieser hierdurch nicht beeinflusst wurde.

Tabelle 16: Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf antioxidative Parameter in Plasma und Leber

	Kontrolle	Traubentrester	Hopfen
Plasma			
α -Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)	$3,84 \pm 1,00$	$3,98 \pm 0,96$	$3,44 \pm 0,84$
γ -Tocopherol ($\mu\text{mol/l}$)	$0,07 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,02^*$	$0,10 \pm 0,02$
TEAC (mmol/l)	$3,15 \pm 0,46$	$3,38 \pm 0,53$	$3,02 \pm 0,39$
TBARS ($\mu\text{mol/l}$)	$1,42 \pm 0,18$	$1,38 \pm 0,20$	$1,39 \pm 0,15$
Leber			
α -Tocopherol (nmol/g)	$14,2 \pm 5,0$	$15,3 \pm 4,4$	$14,3 \pm 5,4$
γ -Tocopherol (nmol/g)	$0,29 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,10$
TEAC ($\mu\text{mol/g}$)	$1,74 \pm 0,13$	$1,76 \pm 0,17$	$1,78 \pm 0,15$
TBARS (nmol/g)	$92,5 \pm 16,0$	$81,8 \pm 19,5$	$90,8 \pm 13,5$

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 16/Gruppe; * P < 0,05. TBARS = thiobarbituric acid reactive substance; TEAC = trolox equivalent antioxidant capacity.

5.2 Ergebnisse aus Ferkelversuch 2

5.2.1 Einfluss von ätherischen Ölen auf Leistungsparameter von Ferkeln

In Ferkelversuch 2 wurden Kontrollferkel und Ferkel, die ätherische Öle erhielten, zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten geschlachtet. Die erste Schlachtung fand am Absetztag (0 Tage nach dem Absetzen) statt. Es folgten Schlachtungen drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen. Zum Zeitpunkt der Geburt waren die Ferkel der beiden Gruppen gleich schwer. Tabelle 17 zeigt die erhobenen Körpergewichte der Ferkel während des Versuchs. Die Behandlung mit ätherischen Ölen wirkte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem Zeitpunkt auf die Körpergewichte der Tiere aus.

Die tägliche Gewichtszunahme, die tägliche Futteraufnahme und die *gain:feed ratio* wurden für die jeweiligen Zeiträume zwischen den Schlachtungen (0 – 3, 3 – 7 und 7 – 21 Tage nach dem Absetzen) erfasst. Diese Parameter wurden als Mittelwerte der Tiere pro Box erhoben und sind in Tabelle 18 dargestellt. Die tägliche Gewichtszunahme, die tägliche Futteraufnahme und die *gain:feed ratio* wurden durch die Supplementierung von ätherischen Ölen in den Zeiträumen 0 – 3, 3 – 7 und 7 – 21 Tage nach dem Absetzen nicht beeinflusst. Die Parameter tägliche Gewichtszunahme, tägliche Futteraufnahme und *gain:feed ratio* wurden zusätzlich für den Gesamtzeitraum des Versuchs 0 – 21 Tage nach dem Absetzen mit $n = 4$ Boxen/Gruppe erfasst. Die tägliche Gewichtszunahme der Ferkel unterschied sich 0 – 21 Tage nach dem Absetzen nicht zwischen den Gruppen Kontrolle und Behandlung. Die tägliche Gewichtszunahme betrug 0 – 21 Tage nach dem Absetzen 280 ± 16 Gramm (Kontrolle) und 282 ± 64 Gramm (Behandlung). Die tägliche Futteraufnahme wurde 0 – 21 Tage nach dem Absetzen durch die Supplementierung von ätherischen Ölen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ($P < 0,05$). Ferkel der Kontrollgruppe nahmen 0 – 21 Tage nach dem Absetzen 267 ± 11 Gramm Futter auf, Ferkel der Behandlungsgruppe 228 ± 26 Gramm Futter. Dadurch ergab sich eine numerisch verbesserte *gain:feed ratio* der Behandlungsgruppe (1236 ± 208 g/kg) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1049 ± 100 g/kg) für den Gesamtzeitraum des Versuchs 0 – 21 Tage nach dem Absetzen, die allerdings nicht signifikant war ($P > 0,05$).

Tabelle 12: Einfluss von ätherischen Ölen auf Körpergewichte beim Ferkel

	Zeitpunkt t				ANOVA (P)		
	0 d n.A. n = 36	3 d n.A. n = 36	7 d n.A. n = 24	21 d n.A. n = 12	MW B	B	t B*t
Körpergewicht (kg)						0,251	< 0,001 0,909
Kontrolle	5,71 ± 0,98	5,81 ± 0,87	6,45 ± 1,01	11,55 ± 1,45	7,38 ± 1,08		
äther. Öle	5,56 ± 1,02	5,60 ± 1,05	6,04 ± 1,20	11,51 ± 1,55	7,18 ± 1,21		
MW t	5,64 ± 1,00 ^A	5,71 ± 0,96 ^{AB}	6,25 ± 1,11 ^B	11,53 ± 1,50 ^C			

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = Tiere/Gruppe; ^{ABC} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeit.

Tabelle 13: Einfluss von ätherischen Ölen auf Leistungsdaten beim Ferkel

	Zeitpunkt t				ANOVA (P)		
	0 - 3 d n.A.	3 - 7 d n.A.	7 - 21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
	n = 6	n = 5	n = 4				
tgl. Gewichtszunahme (g)					0,492	< 0,001	0,697
Kontrolle	40 ± 128	161 ± 51	365 ± 36	189 ± 72			
äther. Öle	9 ± 78	110 ± 85	381 ± 86	167 ± 83			
MW t	25 ± 103 ^A	136 ± 68 ^B	373 ± 61 ^C				
tgl. Futteraufnahme (g)					0,110	< 0,001	0,978
Kontrolle	141 ± 50	170 ± 45	463 ± 31	258 ± 42			
äther. Öle	114 ± 43	148 ± 22	442 ± 29	235 ± 31			
MW t	128 ± 47 ^A	159 ± 34 ^A	453 ± 30 ^B				
gain:feed ratio (g/kg)					0,733	0,010	0,903
Kontrolle	286 ± 1299	945 ± 663	788 ± 58	673 ± 673			
äther. Öle	82 ± 991	743 ± 594	863 ± 185	563 ± 866			
MW t	184 ± 1145 ^A	844 ± 629 ^B	826 ± 122 ^B				

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = Boxen/Gruppe; ^{ABC} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeit; tgl. = tägliche.

5.2.2 Einfluss von ätherischen Ölen auf Signalwege der Stressantwort und des Fettstoffwechsels in der Leber beim Ferkel

Wie beim Ferkelversuch 1 wurde auch der Einfluss von ätherischen Ölen auf Signalwege der Stressantwort und des Fettstoffwechsels in der Leber auf Genexpressions- und Proteinebene untersucht.

5.2.2.1 Einfluss von ätherischen Ölen auf den Nrf2-Signalweg in der Leber beim Ferkel

Der Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung von Ferkeln auf den zytoprotektiven Transkriptionsfaktor Nrf2 in der Leber wurde durch Genexpressionsanalysen von fünf Zielgenen untersucht (Tabelle 19). Die relativen mRNA-Konzentrationen unterschieden sich vor allem in Abhängigkeit vom Zeitverlauf. Dies war bei drei Genen, GPX1, GSTA1 und NQO1, der Fall. Die Genexpression von GPX1 war zum Zeitpunkt des Absetzens am schwächsten und 21 Tage danach am stärksten. Der Unterschied der relativen mRNA-Konzentration von GPX1 war zwischen den beiden vorherig genannten Zeitpunkten signifikant ($P < 0,05$). Bei GSTA1 wurde am Tag des Absetzens ebenfalls die geringste relative mRNA-Konzentration gemessen. Im Vergleich zu dieser waren die GSTA1-Expressionen sieben und 21 Tage nach dem Absetzen signifikant verstärkt ($P < 0,05$). Auch NQO1 wurde am ersten gemessenen Zeitpunkt am geringsten exprimiert. Bereits drei Tage nach dem Absetzen waren die relativen NQO1 mRNA-Konzentrationen signifikant angestiegen ($P < 0,05$). Zum Zeitpunkt 7 Tage nach dem Absetzen bestand im Vergleich zu den anderen analysierten Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied in den relativen mRNA-Konzentrationen. 21 Tage nach Absetzen wurde jedoch wieder eine starke NQO1-Expression festgestellt. Der Unterschied war im Vergleich zum Absetztag signifikant ($P < 0,05$). Im multiplen Mittelwertvergleich wurde bei der SOD zum Zeitpunkt sieben Tage nach dem Absetzen eine tendenzielle Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration im Vergleich zu den Zeitpunkten null und 21 Tage nach dem Absetzen festgestellt ($P < 0,10$). Der Einsatz ätherischer Öle in der Fütterung beeinflusste die Expression der Nrf2-Zielgene in der Leber kaum. Lediglich bei einem Gen, der GSTA1, waren über den Gesamtzeitraum hinweg die relativen mRNA-Konzentrationen bei der Gruppe ätherische Öle im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell vermindert ($P < 0,10$).

Tabelle 19: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten Nr2-Zielgenen in der Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
GPX1						0,823	0,031	0,268
Kontrolle	1,00 ± 0,39	1,08 ± 0,25	0,82 ± 0,36	1,17 ± 0,21	1,02 ± 0,30			
äther. Öle	0,75 ± 0,25	1,04 ± 0,34	1,00 ± 0,36	1,21 ± 0,30	1,00 ± 0,31			
MW t	0,87 ± 0,32 ^A	1,06 ± 0,30 ^{AB}	0,91 ± 0,36 ^{AB}	1,19 ± 0,26 ^B				
GSTA1						0,077	<0,001	0,849
Kontrolle	1,00 ± 0,34	1,42 ± 0,32	2,12 ± 1,34	1,89 ± 0,75	1,61 ± 0,69			
äther. Öle	0,70 ± 0,19	1,13 ± 0,71	1,54 ± 0,64	1,75 ± 0,94	1,28 ± 0,62			
MW t	0,85 ± 0,27 ^A	1,28 ± 0,51 ^{AB}	1,83 ± 0,99 ^B	1,82 ± 0,85 ^B				
HMOX1						0,275	0,056	0,623
Kontrolle	1,00 ± 0,80	1,26 ± 0,61	0,65 ± 0,40	0,69 ± 0,41	0,90 ± 0,55			
äther. Öle	0,90 ± 0,48	0,86 ± 0,37	0,65 ± 0,41	0,67 ± 0,25	0,77 ± 0,38			
MW t	0,95 ± 0,64	1,06 ± 0,49	0,65 ± 0,40	0,68 ± 0,33				
NQO1						0,256	0,002	0,495
Kontrolle	1,00 ± 0,53	2,19 ± 1,05	1,82 ± 0,62	1,77 ± 0,57	1,70 ± 0,69			
äther. Öle	1,12 ± 0,67	1,74 ± 0,79	1,34 ± 0,48	1,75 ± 0,65	1,49 ± 0,65			
MW t	1,06 ± 0,60 ^A	1,96 ± 0,92 ^B	1,58 ± 0,55 ^{AB}	1,76 ± 0,61 ^B				

SOD

Kontrolle	1,00 ± 0,41	1,01 ± 0,21	1,37 ± 0,46	1,03 ± 0,41	1,10 ± 0,37	0,701	0,053	0,521
äther. Öle	0,93 ± 0,29	1,19 ± 0,35	1,21 ± 0,45	0,91 ± 0,18	1,06 ± 0,32			
MW t	0,96 ± 0,35	1,10 ± 0,28	1,29 ± 0,46	0,97 ± 0,30				

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 d n.A.; n = 9/Gruppe; ^{AB} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeitpunkt. GPX1 = glutathione peroxidase 1; GSTA1 = glutathione S-transferase alpha 1; HMOX1 = heme oxygenase (decycling) 1; NQO1 = NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; SOD = superoxide dismutase 1, soluble.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von Nrf2-Zielgenen wurden für den Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen auf Proteinebene validiert. Dazu wurde eine Western Blot Analyse von GPX1 durchgeführt. Die relative Proteinkonzentration der GPX1 wurde zu diesem Zeitpunkt durch den Einsatz von ätherischen Ölen im Futter nicht beeinflusst.

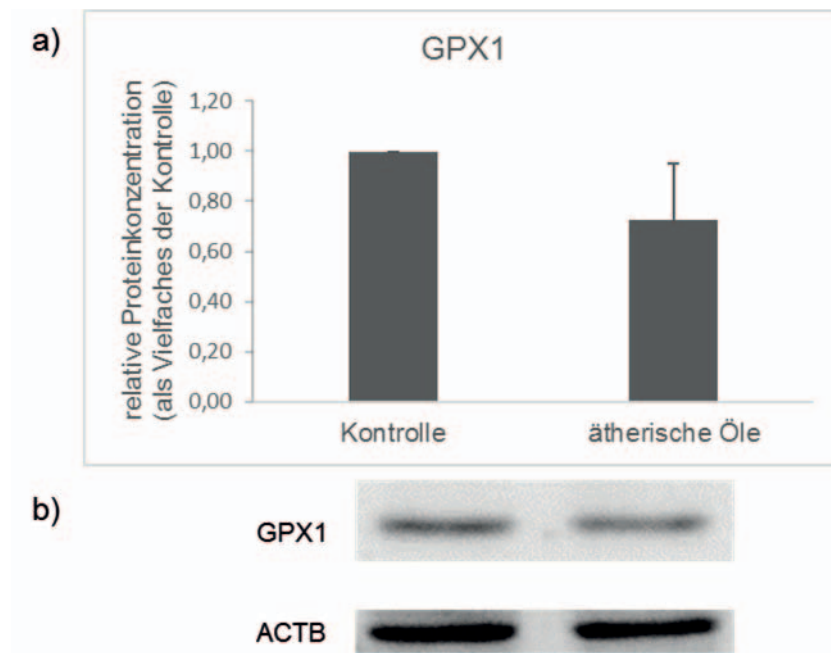


Abbildung 13: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relative Proteinkonzentration der GPX1 im Gesamtprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; $n = 9/\text{Gruppe}$; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins ACTB; b) repräsentativer Blot der GPX1 und des ACTB. ACTB = β -Actin; GPX1 = glutathione peroxidase 1.

5.2.2.2 Einfluss von ätherischen Ölen auf den NF-κB-Signalweg in der Leber beim Ferkel

Um den Einfluss von ätherischen Ölen auf den NF-κB-Signalweg in der Leber zu untersuchen, wurden mRNA-Konzentrationen der NF-κB-Zielgene CCL2, ICAM1, IL1β, SAA2, sowie des TNF (Tabelle 20) bestimmt. Der Einsatz ätherischer Öle in der Fütterung der Ferkel beeinflusste die Genexpressionen aller untersuchten Gene nicht. Lediglich bei zwei Genen, CCL2 und ICAM1, zeigten sich bei der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell geringere relative mRNA-Konzentrationen ($P < 0,10$). Im Falle des CCL2 trat der Behandlungseffekt unabhängig vom Zeitverlauf auf. Die relative CCL2 mRNA-Konzentration wurde zu allen analysierten Zeitpunkten durch den Einsatz der ätherischen Öle erniedrigt. Bei ICAM1 wurde der Behandlungseffekt durch die verschiedenen Zeitpunkte beeinflusst. Nur zum Zeitpunkt drei Tage nach dem Absetzen wurde die ICAM1-Genexpression signifikant durch den Zusatz der ätherischen Öle abgeschwächt ($P < 0,05$). Am Absetztag trat ebenfalls, wenn auch nur numerisch, eine abgeschwächte Expression auf. Sieben und 21 Tage nach dem Absetzen waren die relativen mRNA-Konzentrationen von ICAM1 stattdessen in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrolle numerisch sogar leicht erhöht. Bei vier Genen, CCL2, ICAM1, IL1β und TNF, unterschieden sich die relativen mRNA-Konzentrationen über den Zeitverlauf signifikant ($P < 0,05$). Die relative mRNA-Konzentration von CCL2 war drei und 21 Tage nach dem Absetzen im Vergleich zum Absetztag signifikant erhöht ($P < 0,05$). Sieben Tage nach dem Absetzen war die relative CCL2 mRNA-Konzentration im Vergleich zum Absetztag ebenfalls numerisch erhöht. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die ICAM1 Genexpression war drei Tage nach dem Absetzen im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten signifikant verstärkt ($P < 0,05$). Bei TNF war die relative mRNA-Konzentration drei Tage nach dem Absetzen ebenfalls am höchsten. Der Unterschied war im Vergleich zum Absetztag signifikant ($P < 0,05$). Die ANOVA zeigte auch bei IL1β eine Signifikanz über den Zeitverlauf auf. Im multiplen Mittelwertvergleich war dann lediglich eine Tendenz erkennbar. Die relative mRNA-Konzentration des IL1β war drei und 21 Tage nach dem Absetzen erhöht. Wobei sich im multiplen Mittelwertvergleich lediglich eine tendenzielle Erhöhung der relativen mRNA-Konzentration des IL1β drei Tage nach dem Absetzen im Vergleich zu den Zeitpunkten null und sieben Tage nach dem Absetzen zeigte ($P < 0,10$).

Tabelle 14: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten NF-κB-Zielgenen in der Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
CCL2						0,068	0,004	0,897
Kontrolle	1,00 ± 0,83	2,44 ± 1,62	2,10 ± 1,25	2,69 ± 1,13	2,06 ± 1,21			
äther. Öle	0,77 ± 0,39	1,65 ± 1,21	1,67 ± 1,49	1,97 ± 0,95	1,52 ± 1,01			
MW t	0,88 ± 0,61 ^A	2,04 ± 1,42 ^B	1,88 ± 1,37 ^{AB}	2,33 ± 1,04 ^B				
ICAM1						0,088	< 0,001	0,002
Kontrolle	1,00 ± 0,35	2,10 ± 0,96	0,79 ± 0,51	0,83 ± 0,48	1,18 ± 0,58			
äther. Öle	0,85 ± 0,31	1,04 ± 0,36*	0,99 ± 0,39	0,96 ± 0,37	0,96 ± 0,36			
MW t	0,93 ± 0,33 ^A	1,57 ± 0,66 ^B	0,89 ± 0,45 ^A	0,90 ± 0,43 ^A				
IL1β						0,323	0,029	0,405
Kontrolle	1,00 ± 0,73	3,26 ± 1,50	1,04 ± 0,75	2,81 ± 3,05	2,03 ± 1,51			
äther. Öle	1,39 ± 1,02	2,24 ± 2,78	1,05 ± 0,43	1,43 ± 0,99	1,53 ± 1,30			
MW t	1,19 ± 0,87	2,75 ± 2,14	1,05 ± 0,59	2,12 ± 2,02				
SAAT2						0,134	0,217	0,860
Kontrolle	1,00 ± 0,95	1,40 ± 1,11	0,95 ± 0,81	0,71 ± 0,39	1,01 ± 0,81			
äther. Öle	1,69 ± 1,49	1,77 ± 1,78	1,61 ± 1,76	0,77 ± 0,59	1,46 ± 1,41			
MW t	1,35 ± 1,22	1,58 ± 1,44	1,28 ± 1,29	0,74 ± 0,49				

<i>TNF</i>									
Kontrolle	1,00 ± 0,54	1,85 ± 1,03	1,30 ± 0,98	1,39 ± 0,63	1,39 ± 0,80				
äther. Öle	1,15 ± 0,73	2,03 ± 1,02	1,37 ± 0,55	1,42 ± 0,63	1,49 ± 0,73				
MW t	1,08 ± 0,64 ^A	1,94 ± 1,02 ^B	1,34 ± 0,77 ^{AB}	1,41 ± 0,63 ^{AB}					

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 d n.A.; n = 9/Gruppe; * P (B*) < 0,05; ^{AB} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeitpunkt. CCL2 = chemokine (C-C motif) ligand 2; ICAM1 = intercellular adhesion molecule-1; IL1 β = interleukin-1 beta; SAA2 = serum amyloid A2; TNF = tumor necrosis factor.

Auf Proteinebene wurde zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen kein Konzentrationsunterschied des NF- κ B p50 Proteins in der Leber festgestellt.

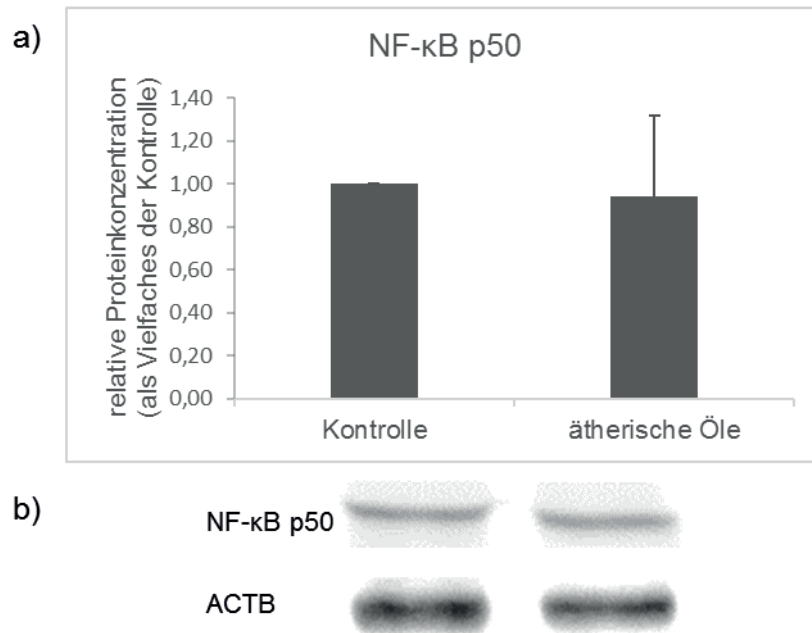


Abbildung 14: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relative Proteinkonzentration von NF- κ B p50 im Nuklearprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; n = 9/Gruppe; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins ACTB; b) repräsentativer Blot des NF- κ B p50 und des ACTB. ACTB = β -Actin; NF- κ Bp50 = nuclear factor kappa B, p50.

5.2.2.3 Einfluss von ätherischen Ölen auf die UPR in der Leber beim Ferkel

Es wurde eine Reihe von Genen der UPR analysiert, die in Tabelle 21 dargestellt sind. Als Vertreter der Chaperone wurden mRNA-Konzentrationen der Hitzeschockproteine HSPA5 und DNAJC3 ermittelt. Des Weiteren wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von PDIA4, einer Proteindisulfidisomerase, und von EDEM1, das der ER assoziierten Degradation (ERAD) angehört, bestimmt. ATF4 wird durch den PERK-Arm der UPR beeinflusst. Vertreter der Apoptose assoziierten Zielgene sind CASP3 und BAX. DDIT3 wurde als wichtigster Induktor der Apoptose ebenfalls ausgewählt. Abschließend ist noch FGF21 zu nennen. FGF21 ist der Ketogenese zuzuordnen und ist sowohl ER-Stress-Zielgen als auch PPAR α -Zielgen.

Der Einsatz ätherischer Öle im Futter beeinflusste sechs der analysierten UPR-Zielgene signifikant ($P < 0,05$) (Tabelle 21). Die relative mRNA-Konzentration von CASP3 war in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe unabhängig vom Zeitverlauf, d.h. zu allen Zeitpunkten, signifikant verringert ($P < 0,05$). Eine verringerte Genexpression durch den Einsatz der ätherischen Öle im Vergleich zur Kontrolle konnte bei DDIT3 ebenfalls zu allen Zeitpunkten festgestellt werden. Der Konzentrationsunterschied der relativen DDIT3 mRNA-Konzentration zwischen den Gruppen ätherische Öle und Kontrolle war zum Zeitpunkt drei Tage nach dem Absetzen signifikant ($P < 0,05$). Bei vier Genen, DNAJC3, FGF21, HSPA5 und PDIA4, wurde ein Effekt der Behandlung mit ätherischen Ölen in Abhängigkeit vom Zeitverlauf festgestellt. Alle vier der oben genannten Gene wiesen drei Tage nach dem Absetzen bei den Behandlungsgruppen signifikant geringere relative mRNA-Konzentrationen auf als in den Kontrollgruppen ($P < 0,05$). Die DNAJC3-Expression der Behandlungsgruppe war am Absetztag in der Tendenz im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls vermindert ($P < 0,10$). Zu den Zeitpunkten sieben und 21 Tage nach dem Absetzen bestand kein signifikanter Konzentrationsunterschied der relativen mRNA-Konzentrationen zwischen der Behandlungsgruppe und der Kontrolle. Die relative mRNA-Konzentration des FGF21 war bei der Gruppe ätherische Öle im Vergleich zur Kontrolle insgesamt erniedrigt. Der mRNA-Konzentrationsunterschied zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe war zum Zeitpunkt drei Tage nach dem Absetzen signifikant ($P < 0,05$). Null und 21 Tage nach dem Absetzen war die relative mRNA-Konzentration des FGF21 der Gruppe ätherischer Öle im Vergleich zur Kontrollgruppe numerisch erniedrigt. Sieben Tage nach dem Absetzen war die relative mRNA-

Konzentration des FGF21 bei der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hingegen numerisch erhöht. Neben dem signifikanten Behandlungseffekt bei HSPA5 zum Zeitpunkt drei Tage nach dem Absetzen traten bei diesem Gen keine weiteren Signifikanzen auf. Am Absetztag wurden bei Behandlungs- und Kontrollgruppe gleich hohe relativen mRNA-Konzentrationen gemessen. Im Gegensatz dazu wurden sieben und 21 Tage nach dem Absetzen durch die ätherischen Öle erhöhte HSPA5-Expressionen festgestellt. Dies war sieben und 21 Tage nach dem Absetzen auch bei der PDIA4-Expression der Fall. Neben der signifikanten Erniedrigung der relativen mRNA-Konzentration in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe drei Tage nach dem Absetzen, zeigte sich dieses Bild numerisch auch null Tage nach dem Absetzen.

Die relativen mRNA-Konzentrationen der UPR-Zielgene wurden ebenfalls durch den Zeitverlauf des Versuchs beeinflusst. Bei BAX, FGF21 und HSPA5, traten die höchsten mRNA-Konzentrationen drei Tage nach dem Absetzen auf. Der Konzentrationsunterschied war bei BAX und HSPA5 zu allen anderen gemessenen Zeitpunkten signifikant ($P < 0,05$). Im Falle des FGF21 wurden drei Tage nach dem Absetzen im Vergleich zu den Zeitpunkten sieben und 21 Tage nach dem Absetzen signifikant höhere Werte erhoben ($P < 0,05$). Der Konzentrationsunterschied zwischen dem Absetztag und drei Tage danach war hingegen nicht signifikant. BAX weist auch an den Tagen sieben und 21 nach dem Absetzen eine hohe Genexpression auf. Die anderen beiden Gene, ATF4 und CASP3, hatten ein abweichendes Genexpressionsprofil. Die höchste relative mRNA-Konzentration von ATF4 wurde sieben Tage nach dem Absetzen festgestellt. Im Vergleich zu den Zeitpunkten null und 21 Tage nach dem Absetzen zeigte sich hier ein tendenzieller Unterschied ($P < 0,10$). Bei CASP3 hingegen war die relative mRNA-Konzentration sieben Tage nach dem Absetzen am niedrigsten. Der höchste Wert wurde bei CASP3 21 Tage nach dem Absetzen erreicht. Im Vergleich zu den Zeitpunkten null und sieben Tage nach dem Absetzen war der Unterschied signifikant ($P < 0,05$). Zwischen den Zeitpunkten drei und 21 Tage nach dem Absetzen trat bei CASP3 kein signifikanter Konzentrationsunterschied auf. Bei DDIT3 wurde in der ANOVA eine Tendenz festgestellt. Im nachfolgenden multiplen Mittelwertvergleich konnte jedoch kein Konzentrationsunterschied der relativen mRNA-Konzentrationen festgestellt werden.

Tabelle 15: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen von ausgewählten UPR-Zielgenen in der Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
ATF4						0,389	0,042	0,717
Kontrolle	1,00 ± 0,34	1,16 ± 0,44	1,37 ± 0,55	0,86 ± 0,38	1,10 ± 0,43			
äther. Öle	0,87 ± 0,28	1,06 ± 0,40	1,17 ± 0,39	0,96 ± 0,37	1,02 ± 0,36			
MW t	0,94 ± 0,31	1,11 ± 0,42	1,27 ± 0,47	0,91 ± 0,38				
BAX						0,245	< 0,001	0,316
Kontrolle	1,00 ± 0,41	2,56 ± 0,92	1,48 ± 0,95	1,82 ± 0,85	1,72 ± 0,78			
äther. Öle	1,00 ± 0,44	1,89 ± 0,53	1,66 ± 0,77	1,45 ± 0,54	1,50 ± 0,57			
MW t	1,00 ± 0,42 ^A	2,23 ± 0,72 ^C	1,57 ± 0,86 ^B	1,64 ± 0,70 ^B				
CASP3						0,015	< 0,001	0,934
Kontrolle	1,00 ± 0,16	1,23 ± 0,35	0,92 ± 0,37	1,36 ± 0,45	1,13 ± 0,33			
äther. Öle	0,80 ± 0,21	0,98 ± 0,38	0,71 ± 0,21	1,25 ± 0,26	0,94 ± 0,26			
MW t	0,90 ± 0,19 ^{AB}	1,11 ± 0,36 ^{BC}	0,82 ± 0,29 ^A	1,31 ± 0,35 ^C				
DDIT3						0,004	0,060	0,100
Kontrolle	1,00 ± 0,59	1,74 ± 0,65	1,24 ± 0,68	0,96 ± 0,52	1,24 ± 0,61			
äther. Öle	0,71 ± 0,39	0,73 ± 0,32 [*]	1,10 ± 0,62	0,75 ± 0,36	0,82 ± 0,42			
MW t	0,85 ± 0,49	1,23 ± 0,49	1,17 ± 0,65	0,85 ± 0,44				

DNAJC3

Kontrolle	1,00 ± 0,41	1,12 ± 0,38	0,70 ± 0,23	0,74 ± 0,23	0,89 ± 0,31	0,157	0,797	0,004
äther. Öle	0,75 ± 0,24 [#]	0,56 ± 0,14 [*]	0,91 ± 0,38	0,85 ± 0,31	0,77 ± 0,27			
MW t	0,87 ± 0,33	0,84 ± 0,26	0,81 ± 0,30	0,80 ± 0,27				

EDEM1

Kontrolle	1,00 ± 0,60	1,75 ± 0,74	1,33 ± 0,68	0,98 ± 0,75	1,27 ± 0,69	0,464	0,183	0,211
äther. Öle	1,01 ± 0,45	1,08 ± 0,70	1,36 ± 0,47	1,17 ± 0,52	1,15 ± 0,54			
MW t	1,00 ± 0,52	1,42 ± 0,72	1,35 ± 0,58	1,08 ± 0,63				

FGF21

Kontrolle	1,00 ± 0,71	1,88 ± 1,66	0,36 ± 0,43	0,30 ± 0,40	0,89 ± 0,80	0,023	0,001	0,025
äther. Öle	0,43 ± 0,35	0,66 ± 0,37 [*]	0,65 ± 0,58	0,20 ± 0,10	0,48 ± 0,35			
MW t	0,72 ± 0,53 ^{AB}	1,27 ± 1,02 ^B	0,51 ± 0,50 ^A	0,25 ± 0,25 ^A				

HSPA5

Kontrolle	1,00 ± 0,55	2,29 ± 1,24	0,69 ± 0,36	0,64 ± 0,35	1,15 ± 0,62	0,452	0,002	0,006
äther. Öle	1,01 ± 0,30	1,08 ± 0,46 [*]	0,97 ± 0,86	1,02 ± 0,83	1,02 ± 0,61			
MW t	1,01 ± 0,42 ^A	1,69 ± 0,85 ^B	0,83 ± 0,61 ^A	0,83 ± 0,59 ^A				

PDIA4

Kontrolle	1,00 ± 0,38	1,27 ± 0,44	0,75 ± 0,21	0,64 ± 0,23	0,91 ± 0,31	0,222	0,153	0,004
äther. Öle	0,79 ± 0,26	0,71 ± 0,20 [*]	0,86 ± 0,32	0,87 ± 0,35	0,81 ± 0,28			
MW t	0,90 ± 0,32	0,99 ± 0,32	0,80 ± 0,27	0,75 ± 0,29				

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 d n.A.; n = 9/Gruppe; * P (B*) < 0,05; # P (B*) < 0,10; ^{ABC} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeitpunkt. ATF4 = activating transcription factor 4; BAX = BCL2-associated X protein; CASP3 = caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase; DDIT3 = DNA-damage-inducible transcript 3; DNAAJC3 = DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3; EDEM1 = ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 1-like; FGF21 = fibroblast growth factor 21; HSPA5 = heat shock 70kDa protein 5; PDIA4 = protein disulfide isomerase family A, member 4.

Zur Validierung der Genexpressionsanalysen wurden die relativen Proteinkonzentrationen von PERK und phosphoryliertem PERK mithilfe einer Western Blot Analyse für den Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen bestimmt. Auf Proteinebene konnten in der Leber keine Konzentrationsunterschiede der relativen Proteinkonzentrationen von PERK und phosphoryliertem PERK zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen zwischen den Gruppen ätherische Öle und Kontrolle festgestellt werden.

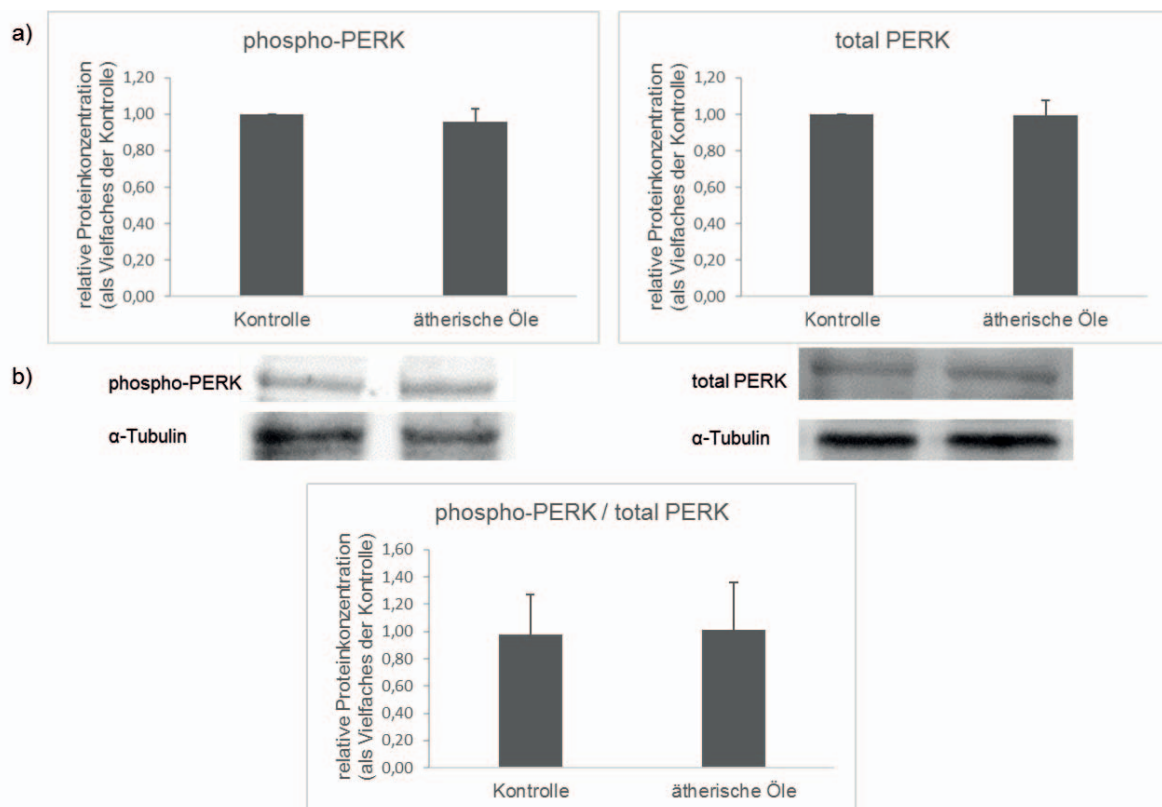


Abbildung 15: Einfluss von ätherischen Ölen auf die relativen Proteinkonzentrationen von total PERK und phospho-PERK im Gesamtprotein der Leber zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen

a) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe; $n = 9/\text{Gruppe}$; die Normalisierung erfolgte mithilfe des Referenzproteins α -Tubulin; b) repräsentativer Blot des total PERK, phospho-PERK und der dazugehörigen α -Tubuline. PERK = *protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*.

Zusätzlich wurden Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber erhoben, da die UPR zu einer gesteigerten Lipogenese in der Leber führen kann. Die Triglyceridkonzentrationen wurden durch die Behandlung mit ätherischen Ölen im Vergleich zur Kontrollgruppe in Plasma und Leber signifikant gesenkt ($P < 0,05$) (Tabelle 22). Dieser Behandlungseffekt wurde in beiden Fällen durch den Faktor Zeit beeinflusst. Zum Zeitpunkt des Absetzens zeigte sich sowohl im Plasma als auch in der Leber ein signifikanter Konzentrationsunterschied der Triglyceride zwischen der Kontroll- und Behandlungsgruppe. Die Tiere, die als zusätzliche Futterkomponente ätherische Öle erhalten hatten, wiesen signifikant geringere Triglyceridkonzentrationen auf als die Kontrolltiere ($P < 0,05$). Insgesamt nahmen die Konzentrationen, sowohl im Plasma als auch im Lebergewebe, mit zunehmendem Alter der Ferkel ab. Die Konzentrationen drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen waren im Vergleich zum Absetztag signifikant verringert ($P < 0,05$). In der Leber war der Konzentrationsabfall stärker als im Plasma.

Tabelle 16: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
Plasma						0,051	< 0,001	< 0,001
(mmol/l)								
Kontrolle	1,25 ± 0,43	0,60 ± 0,24	0,35 ± 0,09	0,38 ± 0,06	0,65 ± 0,21			
äther. Öle	0,65 ± 0,10*	0,63 ± 0,26	0,35 ± 0,06	0,40 ± 0,08	0,51 ± 0,13			
MW t	0,95 ± 0,27 ^C	0,62 ± 0,25 ^B	0,35 ± 0,08 ^A	0,39 ± 0,07 ^A				
Leber						0,024	< 0,001	< 0,001
(µmol/g)								
Kontrolle	7,54 ± 2,67	2,37 ± 0,68	2,81 ± 0,47	1,83 ± 0,29	3,64 ± 1,03			
äther. Öle	4,51 ± 1,48*	3,03 ± 1,48	2,51 ± 0,47	1,72 ± 0,25	2,94 ± 0,92			
MW t	6,03 ± 2,08 ^B	2,70 ± 1,08 ^A	2,66 ± 0,47 ^A	1,78 ± 0,27 ^A				

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 d n.A.; n = 9/Gruppe; * P (B*t) < 0,05; _{ABC} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen.

5.2.2.4 Einfluss von ätherischen Ölen auf die Fettsäuresynthese in der Leber beim Ferkel

In der Leber wird die Fettsäuresynthese vor allem durch das *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP-1c) reguliert (Shimomura et al. 1997). SREBP-1c wird auch als *sterol regulatory element binding transcription factor 1* (SREBF1) bezeichnet. Um den Einfluss von ätherischen Ölen auf die Fettsäuresynthese in der Leber zu untersuchen, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBF1 und ausgewählter Zielgene des SREBF1 ermittelt. Dies waren die Acetyl-CoA Carboxylase α (ACACA), die Fettsäuresynthase (FASN), die Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) und das Malic-Enzym 1 (ME1).

Wie der Tabelle 23 zu entnehmen ist, blieben die relativen mRNA-Konzentrationen aller analysierten Zielgene durch die Supplementierung mit ätherischen Ölen im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst. Allerdings wiesen alle Gene eine signifikante Erhöhung der relativen mRNA-Konzentrationen über den Zeitverlauf auf ($P < 0,05$). Die relative mRNA-Konzentration des SREBF1 war zu den Zeitpunkten drei und sieben Tage nach dem Absetzen signifikant höher als am Tag des Absetzens ($P < 0,05$). Bei FASN und GPAT waren die relativen mRNA-Konzentrationen am Absetztag gegenüber den anderen Zeitpunkten erniedrigt. Bei FASN waren die Standardabweichungen sehr hoch. Trotzdem ließen sich beim Vergleich der Zeitpunkte Signifikanzen feststellen ($P < 0,05$), die beim Vergleich der beiden Zeitpunkte drei und 21 Tage nach dem Absetzen mit dem Zeitpunkt null Tage nach dem Absetzen auftraten. Bei GPAT waren die relativen mRNA-Konzentrationen aller drei anderen Zeitpunkte im Vergleich mit dem Absetztag signifikant erhöht ($P < 0,05$). Die relativen mRNA-Konzentrationen von ACACA und ME1 stiegen erst 21 Tage nach dem Absetzen an. Zu diesem Zeitpunkt ließen sich gegenüber den Zeitpunkten null, drei und sieben Tage nach dem Absetzen signifikant höhere Genexpressionen feststellen ($P < 0,05$).

Tabelle 17: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Zielgene der Fettsäuresynthese in der Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
ACACA						0,343	0,002	0,538
Kontrolle	1,00 ± 0,51	1,07 ± 0,47	1,02 ± 0,46	1,74 ± 0,56	1,21 ± 0,50			
äther. Öle	1,07 ± 0,42	0,89 ± 0,44	1,03 ± 0,47	1,37 ± 0,48	1,09 ± 0,45			
MW t	1,03 ± 0,46 ^A	0,98 ± 0,46 ^A	1,02 ± 0,47 ^A	1,55 ± 0,52 ^B				
FASN						0,371	< 0,001	0,581
Kontrolle	1,00 ± 0,84	10,38 ± 8,84	4,48 ± 4,08	7,87 ± 4,26	5,93 ± 4,51			
äther. Öle	1,49 ± 1,16	6,66 ± 4,68	3,98 ± 2,83	7,33 ± 4,28	4,86 ± 3,23			
MW t	1,25 ± 1,00 ^A	8,52 ± 6,76 ^C	4,23 ± 3,45 ^{AB}	7,60 ± 4,27 ^{BC}				
GPAT						0,427	< 0,001	0,340
Kontrolle	1,00 ± 0,33	5,16 ± 1,80	4,43 ± 1,63	5,47 ± 3,44	4,02 ± 1,80			
äther. Öle	1,62 ± 0,79	4,51 ± 2,20	4,56 ± 1,49	3,88 ± 1,03	3,64 ± 1,38			
MW t	1,31 ± 0,56 ^A	4,83 ± 2,00 ^B	4,50 ± 1,56 ^B	4,68 ± 2,23 ^B				
ME1						0,307	< 0,001	0,708
Kontrolle	1,00 ± 0,40	0,96 ± 0,30	0,90 ± 0,28	1,96 ± 1,11	1,20 ± 0,52			
äther. Öle	0,64 ± 0,29	1,01 ± 0,52	0,89 ± 0,26	1,73 ± 0,72	1,07 ± 0,45			
MW t	0,82 ± 0,34 ^A	0,98 ± 0,41 ^A	0,89 ± 0,27 ^A	1,84 ± 0,91 ^B				

5.2.2.5 Einfluss von ätherischen Ölen auf den PPAR α -Signalweg und den Carnitinstoffwechsel in der Leber beim Ferkel

Zur Überprüfung des Einflusses von ätherischen Ölen auf den Lipidstoffwechsel in der Leber, wurden neben den relativen mRNA-Konzentrationen des SREBF1 auch die von PPAR α -Zielgenen und Zielgenen des Carnitinstoffwechsels ermittelt. Dazu gehörte die LPL, die die Hydrolyse von Triglyceriden katalysiert, und die an der Fettsäureaufnahme beteiligten Gene CD36, CPT1A, FABP1, SLC25A20 und SLC27A1. ACOX1 und CYP4A24 können der Fettsäureoxidation zugeordnet werden. FGF21 als Vertreter der Ketogenese ist Zielgen des PPAR α und des ER Stresses und wurde bereits unter 5.2.2.3 beschrieben. Zielgene des Carnitinstoffwechsels sind BBOX1 und SLC22A5. BBOX1 reguliert die Carnitinbiosynthese. SLC22A5 ist als membranöses Transportprotein für die Aufnahme von Carnitin in die Zelle verantwortlich. Dargestellt sind die Ergebnisse in Tabelle 24.

Bei Betrachtung der relativen mRNA-Konzentrationen zwischen den Behandlungsgruppen ließen sich außer bei FGF21 bei zwei weiteren Genen signifikante Unterschiede der relativen mRNA-Konzentrationen feststellen ($P < 0,05$). Dies waren CPT1A und FABP1. Eine von dem Zeitverlauf unbeeinflusste signifikante Abschwächung der Genexpression bei der Behandlungsgruppe mit ätherischen Ölen im Vergleich zur Kontrollgruppe trat bei FABP1 auf. Zu allen vier Zeitpunkten zeigten sich bei den Tieren, die ätherische Öle erhielten, signifikant geringere relative mRNA-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrolltieren ($P < 0,05$). Auch bei CPT1A war die relative mRNA-Konzentration der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe insgesamt signifikant verringert ($P < 0,05$). Der Konzentrationsunterschied wurde jedoch durch den Faktor Zeit beeinflusst. Nur am Absetztag exprimierten die Ferkel, die ätherische Öle erhielten, signifikant weniger CPT1A mRNA als die Kontrollferkel. Drei und sieben Tage nach dem Absetzen war der Unterschied nicht signifikant. Sieben Tage nach dem Absetzen trat kein Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Gruppen auf. In der Tendenz wurde bei CYP4A24 in der Behandlungsgruppe insgesamt ebenfalls eine geringere relative mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt ($P < 0,10$). Auch bei CYP4A24 bestand eine Abhängigkeit zum Faktor Zeit. Drei Tage nach dem Absetzen war die schwächere Genexpression der Gruppe ätherische Öle in Vergleich zur Kontrolle im multiplen Mittelwertvergleich signifikant ($P < 0,05$). Am Tag des Absetzens

war der beobachtete Behandlungseffekt nicht signifikant. Sieben und 21 Tage nach dem Absetzen bestanden keine Konzentrationsunterschiede der relativen mRNA zwischen den verglichenen Gruppen. Zeitunabhängig blieb die Genexpression des SLC25A20 von dem Zusatz der ätherischen Öle unbeeinflusst. In Abhängigkeit vom Zeitverlauf traten jedoch Unterschiede in den Höhen der relativen mRNA-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen ätherische Öle und Kontrolle auf. Die Behandlungseffekte waren zwischen den verschiedenen Zeitpunkten kontrastiert. Die relative mRNA-Konzentration des SLC25A20 war zum Zeitpunkt des Absetzens bei der Behandlungsgruppe signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

Sieben der elf analysierten Zielgene wiesen Signifikanzen bei der Genexpression über den Zeitverlauf auf. Wobei die relativen mRNA-Konzentrationen bei vier Genen (ACOX1, BBOX1, CYP4A24, FABP1) am Ende des Untersuchungszeitraumes anstiegen und bei drei Genen (CD36, CPT1A, FGF21) abfielen. FGF21 wird im Folgenden nicht näher beschrieben, da dies in 5.2.2.3 nachzulesen ist. Bei ACOX1, BBOX1, CYP4A24 und FABP1 waren die relativen mRNA-Konzentrationen 21 Tage nach dem Absetzen am höchsten. Die relative mRNA-Konzentrationen des CYP4A24 wurde zusätzlich drei Tage nach dem Absetzen vermehrt exprimiert. Ein konstanter Anstieg der relativen mRNA-Konzentrationen über den Zeitverlauf zeigte sich bei BBOX1. ACOX1 und FABP1 wiesen im Vergleich zum Absetztag erst 21 Tage danach einen signifikanten Konzentrationsunterschied der relativen mRNA auf ($P < 0,05$). Bei CD36 war die relative mRNA-Konzentrationen entgegen der anderen Gene 21 Tage nach dem Absetzen am geringsten. Der Konzentrationsunterschied war bei CD36 im Vergleich zum Zeitpunkt drei Tage nach dem Absetzen signifikant ($P < 0,05$). Eine ebenfalls am Ende des Untersuchungszeitraumes geringe relative mRNA-Konzentration trat bei CPT1A auf. Dieses Gen zeigte seine höchste relative mRNA-Konzentration zum Zeitpunkt des Absetzens. An allen anderen Zeitpunkten war die Genexpression signifikant vermindert ($P < 0,05$).

Tabelle 18: Einfluss ätherischer Öle in der Fütterung auf die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Zielgene des PPAR α und des Carnitinstoffwechsels in der Leber beim Ferkel

	Zeitpunkt t					ANOVA (P)		
	0 d n.A.	3 d n.A.	7 d n.A.	21 d n.A.	MW B	B	t	B*t
ACOX1						0,467	0,007	0,591
Kontrolle	1,00 \pm 0,23	0,98 \pm 0,33	0,95 \pm 0,19	1,43 \pm 0,53	1,09 \pm 0,32			
äther. Öle	0,84 \pm 0,29	0,92 \pm 0,41	1,08 \pm 0,44	1,23 \pm 0,43	1,02 \pm 0,39			
MW t	0,92 \pm 0,26 ^A	0,95 \pm 0,37 ^A	1,01 \pm 0,31 ^{AB}	1,33 \pm 0,48 ^B				
BBOX1						0,713	< 0,001	0,435
Kontrolle	1,00 \pm 0,37	1,54 \pm 0,37	1,59 \pm 0,54	2,11 \pm 0,58	1,56 \pm 0,46			
äther. Öle	0,73 \pm 0,19	1,63 \pm 0,54	1,77 \pm 0,49	1,84 \pm 0,59	1,49 \pm 0,45			
MW t	0,87 \pm 0,28 ^A	1,59 \pm 0,46 ^B	1,68 \pm 0,51 ^B	1,98 \pm 0,58 ^B				
CD36						0,611	0,028	0,254
Kontrolle	1,00 \pm 0,60	1,06 \pm 0,53	0,76 \pm 0,42	0,62 \pm 0,32	0,88 \pm 0,47			
äther. Öle	0,73 \pm 0,18	1,27 \pm 0,52	1,07 \pm 0,39	0,68 \pm 0,41	0,93 \pm 0,37			
MW t	0,86 \pm 0,39 ^{AB}	1,16 \pm 0,52 ^B	0,91 \pm 0,40 ^{AB}	0,68 \pm 0,36 ^A				
CPT1A						0,003	< 0,001	0,008
Kontrolle	1,00 \pm 0,35	0,43 \pm 0,10	0,20 \pm 0,07	0,31 \pm 0,08	0,49 \pm 0,15			
äther. Öle	0,65 \pm 0,17*	0,34 \pm 0,11	0,22 \pm 0,06	0,26 \pm 0,07	0,37 \pm 0,10			
MW t	0,82 \pm 0,26 ^C	0,39 \pm 0,11 ^B	0,21 \pm 0,06 ^A	0,29 \pm 0,07 ^{AB}				

CYP4A24

Kontrolle	1,00 ± 0,65	2,57 ± 1,05	1,08 ± 0,70	1,68 ± 0,66	1,58 ± 0,77	0,060	< 0,001	0,093
äther. Öle	0,52 ± 0,29	1,49 ± 1,03*	1,12 ± 0,49	1,75 ± 0,72	1,22 ± 0,63			
MW t	0,76 ± 0,47 ^A	2,03 ± 1,04 ^B	1,10 ± 0,59 ^A	1,72 ± 0,69 ^B				

FABP1

Kontrolle	1,00 ± 0,29	1,37 ± 0,72	1,20 ± 0,67	1,49 ± 0,75	1,26 ± 0,61	0,001	0,022	0,698
äther. Öle	0,49 ± 0,17	0,67 ± 0,28	0,88 ± 0,35	1,17 ± 0,57	0,80 ± 0,34			
MW t	0,75 ± 0,23 ^A	1,02 ± 0,50 ^{AB}	1,04 ± 0,51 ^{AB}	1,33 ± 0,66 ^B				

LPL

Kontrolle	1,00 ± 2,33	3,95 ± 4,64	0,69 ± 0,77	2,74 ± 4,55	2,09 ± 3,07	0,672	0,063	0,793
äther. Öle	1,04 ± 0,65	2,13 ± 3,71	0,50 ± 0,39	3,09 ± 4,71	1,69 ± 2,36			
MW t	1,02 ± 1,49	3,04 ± 4,18	0,60 ± 0,58	2,92 ± 4,63				

SLC22A5

Kontrolle	1,00 ± 0,38	0,87 ± 0,39	1,03 ± 0,46	0,85 ± 0,40	0,94 ± 0,41	0,556	0,730	0,958
äther. Öle	0,93 ± 0,29	0,88 ± 0,38	0,90 ± 0,35	0,83 ± 0,42	0,88 ± 0,36			
MW t	0,96 ± 0,33	0,88 ± 0,39	0,96 ± 0,41	0,84 ± 0,41				

SLC25A20

Kontrolle	1,00 ± 0,37	0,72 ± 0,30	0,65 ± 0,15	0,74 ± 0,24	0,78 ± 0,27	0,526	0,814	0,027
äther. Öle	0,65 ± 0,18*	0,91 ± 0,39	0,88 ± 0,34 [#]	0,80 ± 0,27	0,81 ± 0,29			
MW t	0,83 ± 0,28	0,82 ± 0,34	0,76 ± 0,25	0,77 ± 0,25				

SLC27A1

Kontrolle	1,00 ± 0,16	1,26 ± 0,60	1,78 ± 1,13	1,38 ± 1,05	1,36 ± 0,74	0,523	0,281	0,530
äther. Öle	1,03 ± 0,31	1,38 ± 0,61	1,22 ± 0,55	1,36 ± 0,81	1,25 ± 0,57			
MW t	1,01 ± 0,23	1,32 ± 0,60	1,50 ± 0,84	1,37 ± 0,93				

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen als Vielfaches der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 d n.A.; n = 9/ Gruppe; * P (B*) < 0,05; # P (B*) < 0,10; ^{AB} P (t) < 0,05. äther. = ätherische; B = Behandlung; d n.A. = Tage nach dem Absetzen; MW = Mittelwert; t = Zeitpunkt. ACOX1 = acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl; BBOX1 = butyrobetaine, 2-oxoglutarate dioxygenase 1; CD36 = CD36 molecule; CPT1A = carnitine palmitoyltransferase 1A; CYP4A24 = cytochrome P450 4A24; FABP1 = fatty acid binding protein 1; LPL = lipoprotein lipase; SLC22A5 = solute carrier family 22, member 5; SLC25A20 = solute carrier family 25, member 20; SLC27A1 = solute carrier family 27, member 1

6 Diskussion

Für Ferkel ist das Absetzen eine stressige Erfahrung mit sozialer und physiologischer Beeinflussung. Das konventionelle Absetzen erfolgt mit drei bis fünf Wochen. Genau zu diesem Zeitpunkt ist die Immunabwehr der Ferkel besonders schwach. Die Ferkel kommen ohne schützende Immunität auf die Welt. Sie sind darauf angewiesen über das Kolostrum der Sau eine passive Immunität zu erwerben. Diese schützt die Ferkel über zehn bis 14 Tage. Die Entwicklung des eigenen Immunsystems beginnt mit 21 bis 28 Lebenstagen (Roese und Taylor 2006). Es entsteht eine immunologische Lücke. Hinzu kommt, dass Stress die Produktion von Antikörpern negativ beeinflusst und im neuen Stall ein veränderter Keimdruck herrscht. Aus genannten Gründen ist das Risiko für Erkrankungen während der Absetzphase besonders hoch.

Zur Prophylaxe wurden in der Vergangenheit Fütterungsantibiotika eingesetzt. Seit Januar 2006 ist dieser Einsatz aufgrund vermehrter bakterieller Resistenzen in der europäischen Union verboten (Pluske 2013). Phytotherapeutika stellen eine mögliche Alternative dar (Hume 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von zwei polyphenolhaltigen Pflanzenprodukten, Hopfentreber und Traubentrester, und der eines Produkts, das ätherische Öle enthielt, auf biochemische Signalwege in der Leber beim Ferkel untersucht. Die untersuchten Signalwege standen in Verbindung mit Inflammation, der antioxidativen und zytoprotektiven Kapazität, dem Fremdstoffmetabolismus, ER-Stress und dem Lipidstoffwechsel. Hierfür wurden Zielgene des NF- κ B, des Nrf2, der UPR, des SREBF1 und des PPAR α analysiert. Da die Genexpressionen die tatsächlichen Proteinkonzentrationen nicht zuverlässig widerspiegeln, erfolgte eine Validation der erhobenen Daten durch Messungen ausgewählter Proteine dieser Signalwege.

6.1 Einfluss von phytoenen Futterkomponenten auf ER-Stress und Inflammation in der Leber beim Ferkel

In den Genexpressionsanalysen hatte die Supplementierung der polyphenolreichen Futterzusätze und ätherischen Öle geringe bis keine Effekte auf Inflammation, Zytoprotektion, Fremdstoffmetabolismus und ER-Stress in der Leber abgesetzter Ferkel. Auch auf Proteinebene wurden keine Konzentrationsunterschiede festgestellt. Das Ausbleiben eines antiinflammatorischen und zytoprotektiven Effekts steht im Widerspruch zu verschiedenen Studien im Nagermodell. Insbesondere polyphenolreiche Diäten konnten hier positive Effekte auf das Inflammationsgeschehen und ER-Stress in der Leber erzielen. Gleichzeitig wurde die antioxidative und zytoprotektive Kapazität über eine Nrf2-Aktivierung erhöht. Der hepatische Fremdstoffwechsel wurde durch die polyphenolreiche Diäten induziert (Farombi et al. 2008; Kim et al. 2008; Patel und Maru 2008; Natsume et al. 2009; Noh et al. 2011; Park et al. 2011; Panchal et al. 2012; Andrade et al. 2014; Ha et al. 2014; Molina et al. 2015; Pan et al. 2015). Für ätherische Öle sind ebenfalls antiinflammatorische und hepatoprotektive Eigenschaften beschrieben. In Nagern wurde die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in der Leber, ebenso wie die NF- κ B-Aktivierung, durch ätherische Öle inhibiert (Lai et al. 2014; Li et al. 2014; Funk et al. 2016; Li et al. 2016). Eine mögliche Begründung der Ergebnisdifferenz zwischen den Nagerstudien und der vorliegenden Arbeit besteht in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Für die Ferkelversuche wurden gesunde Tiere verwendet, die eine bedarfsdeckende Diät erhielten und außer dem Absetzen keinen zusätzlichen Stressoren ausgesetzt waren. Die Nager der oben genannten Studien wurden zusätzlich zu den eingesetzten phytoenen Futterkomponenten prooxidativen und proinflammatorischen Behandlungen ausgesetzt. Dies waren beispielsweise eine proinflammatorisch wirkende „*high fat diet*“ oder eine Lipopolysaccharid-induzierte (LPS) akute Inflammation. Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit denen der Nagerstudien deutet stark darauf hin, dass phytoene Futterkomponenten ihr gesundheitsförderndes Potential nur unter pathologischen Bedingungen voll entfalten, nicht aber in gesunden Tieren. Um diese Aussage bestätigen zu können, sind weitere Forschungsarbeiten notwendig, bei denen phytoene Futterkomponenten bei Ferkeln unter proinflammatorischer Belastung eingesetzt werden. Bisher existieren nur sehr wenige Studien bezüglich eines potentiellen Effekts von phytoenen

Futterkomponenten auf das Inflammationsgeschehen im Schwein. In der Studie von Gessner et al. (2013) rief der Einsatz von 1 % Traubentrester in der Futterration ein Herunterregulieren verschiedener proinflammatorischer Gene im Duodenum wachsender Schweine hervor. Die gleiche Beobachtung machten Fiesel et al. (2014) durch die Supplementierung von 1 % Traubentrester oder 1 % Hopfentreber in Duodenum, Ileum und Kolon von Ferkeln. Die Expressionen proinflammatorischer NF- κ B-Zielgene waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert. Studien zu Expressionen proinflammatorischer Gene in anderen Geweben als dem Dünndarm sind bislang nicht veröffentlicht. In der vorliegenden Arbeit wurden diese untersucht, jedoch wurde durch den Einsatz der polyphenolhaltigen Futterkomponenten Traubentrester und Hopfentreber kein Effekt auf stressresponsive Signalwege in der Leber beim Ferkel erzielt. Der Einsatz des Präparates, das ätherische Öle enthielt, zeigte nur einen marginalen Effekt, der sich im Herunterregulieren einiger UPR-Zielgene äußerte. Ursache für die fehlende antiinflammatorische Wirkung der phytogenen Futterkomponenten in der Leber beim Ferkel im Gegensatz zu den antiinflammatorischen Effekten im Dünndarm der oben zitierten Studien kann die niedrige orale Bioverfügbarkeit der getesteten Futterzusätze sein. Sekundäre Pflanzenstoffe werden im oberen Gastrointestinaltrakt nur zu einem geringen Anteil absorbiert. Für Polyphenole sind Absorptionsraten von 5-10 % beschrieben (Faria et al. 2014). Auch ätherische Öle werden nur zu einem geringen Anteil absorbiert. Eine weitere Einschränkung der oralen Bioverfügbarkeit ist die rasche Metabolisierung in den Enterozyten und der Leber (Kohlert et al. 2000; Romo Vaquero et al. 2013). Sekundäre Pflanzenstoffe werden im Körper als Xenobiotika detektiert. Es erfolgt eine extensive Biotransformation über klassische Detoxifizierungsmechanismen wie Methylierung, Sulfatierung und Glucuronidierung. Durch die Konjugationen entstehen eine große Anzahl hydrophiler (methylierter, glucuronidierter, sulfatierter) Metaboliten, die rasch über die Galle und vor allem die Nieren eliminiert werden (Kohlert et al. 2000; D'Archivio et al. 2007; Brenes und Roura 2010). Aufgrund der geringen Absorption, der extensiven Biotransformation und der Exkretion der Metabolite ergeben sich für sekundäre Pflanzenstoffe wie dem Quercetin nach oraler Supplementierung geringe Konzentrationsspiegel im Plasma und Gewebe. Auch eine Langzeit-Supplementierung führt nicht zur Akkumulation im Plasma oder Gewebe (Bieger et al. 2008; Reinboth et al. 2010). Darüber hinaus können die gesundheitsfördernden Effekte von sekundären Pflanzenstoffen bzw. die bei ihrer Biotransformation entstehenden konjugierten

Metabolite nicht ohne weiteres vom Nager auf andere Spezies übertragen werden, da geschlechts- (Mugford und Kedderis 1998; Renaud et al. 2011; Liu et al. 2013; Ruiz et al. 2013) und speziesspezifische (Matal et al. 2008; Yamazaki et al. 2011; Helke und Swindle 2013; Saengtienchai et al. 2014) Unterschiede im Fremdstoffstoffwechsel existieren. Die analysierten Phase I und II Enzyme des hepatischen Fremdstoffmetabolismus zeigten in der vorliegenden Arbeit keine gesteigerte Expressionsaktivität durch den Einsatz der polyphenolhaltigen Futterzusätze Traubentrester und Hopfentreber. Das Ausbleiben eines antiinflammatorischen und zytoprotektiven Effekts durch die phytogenen Futterkomponenten auf Genexpressionen in der Leber beim Ferkel scheint daher eher durch eine geringe Absorption begründet zu sein. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass gesunde Ferkel verwendet worden sind, die keiner proinflammatorischer Belastung ausgesetzt waren. Dass in anderen Studien antiinflammatorische Effekte im Dünndarm durch die orale Supplementierung von polyphenolhaltigen Futterkomponenten induziert werden konnten (Gessner et al. 2013; Fiesel et al. 2014), welche in der Leber hingegen nicht gezeigt werden konnten, liegt möglicherweise an hohen lokalen Konzentrationen der Polyphenole in den Enterozyten. Darüber hinaus konnten Polyphenolen präbiotische Aktivität nachgewiesen werden. Das Wachstum pathogener Darmbakterien wird durch Polyphenole gehemmt, während das günstiger Bakterien gefördert wird (Axling et al. 2012; China et al. 2012; Queipo-Ortuño et al. 2012; Etxeberria et al. 2013; Etxeberria et al. 2015; Moreno-Indias et al. 2016). Der antiinflammatorische Effekt der Polyphenole im Dünndarm kann also durch einen günstigen Effekt auf die Darmflora auch von sekundärer Natur sein.

6.2 Einfluss von polyphenolhaltigen Futterkomponenten auf den antioxidativen Status in der Leber beim Ferkel

Antioxidative Eigenschaften wurden schon des Öfteren für Polyphenole beschrieben (Rice-Evans et al. 1995; Salah et al. 1995; Scalbert et al. 2005; Seeram et al. 2005; Torabian et al. 2009; Kim et al. 2012). Diese beziehen sich jedoch auf *in vitro* Studien oder Studien in Nagern. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung zweier Polyphenolquellen (Traubentrester, Hopfentreber), beim Nutztier Schwein zu testen. Dafür wurden Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) in Leber und Plasma gemessen. Sie dienen als Indikator für die Lipidperoxidation in Geweben, da deren

Abbauprodukte erfasst werden. Wichtigstes Beispiel ist Malondialdehyd (MDA) als Abbauprodukt der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Aber auch andere Carbonylverbindungen, hauptsächlich Aldehyde und Ketone, werden erfasst. Aufgrund dieser Unspezifität wurde zusätzlich die totale antioxidative Kapazität (TEAC) und der Vitamin E Gehalt (α - und γ -Tocopherol) bestimmt. Vitamin E, insbesondere der Anteil des α -Tocopherols, ist das wichtigste, biologische, fettlösliche Antioxidans im Plasma von Säugetieren (Burton et al. 1982; Burton und Ingold 1986; Kamal-Eldin und Appelqvist 1996). Der Gehalt an Antioxidantien im Gewebe steigt bei einer reduzierten Lipidperoxidation an (Oldham und Bowen 1998). Die Supplementierung von polyphenolreichen Futterzusätzen beeinflusste die erhobenen Parameter nicht. Die einzige signifikante Konzentrationserhöhung trat beim γ -Tocopherol-Gehalt im Plasma auf und wurde durch den Futterzusatz von 1 % Traubentrester hervorgerufen. Da γ -Tocopherol am Gesamtvitamin E Gehalt eine untergeordnete Rolle spielt, kann dies in Bezug auf den antioxidativen Status des Tieres vernachlässigt werden. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines systemischen antioxidativen Effekts ist die in 6.2 erwähnte geringe Bioverfügbarkeit von Polyphenolen, wodurch in den Geweben nur geringe Konzentrationsspiegel erreicht werden. Aus labortechnischen Gründen konnten diese nicht im Plasma und der Leber gemessen werden. Auch andere Studien belegen, dass Polyphenole unter physiologischen Bedingungen wenig zu der totalen antioxidativen Kapazität beitragen. Diese wird durch andere Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, Tocopherole oder Harnsäure, weitaus stärker beeinflusst (Surai 2014). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit stimmt mit zwei weiteren Studien überein, die bestätigen, dass der diätetische Einsatz von Polyphenolen den antioxidativen Status von gesunden Schweinen nicht beeinflussen. Bei den Polyphenolquellen dieser Studien handelte es sich um ein catechinreiches Extrakt aus grünem Tee (Augustin et al. 2008) bzw. um eine Extraktmischung aus Äpfeln, Trauben, grünem Tee und Olivenblättern (Zhang et al. 2016). Im Gegensatz dazu existieren auch Studien, die eine Verbesserung des antioxidativen Status von Schweinen durch Polyphenole belegen (Luehring et al. 2011; Wang et al. 2012; Hou et al. 2014). Der Unterschied besteht darin, dass diese Tiere zusätzlich eine prooxidative oder proinflammatorische Behandlung erfahren hatten. So induzierten Luehring et al. (2011) beispielsweise oxidativen Stress durch die additive Supplementierung von Fischöl bei wachsenden Schweinen. Der Einsatz von Quercetin führte in diesem Zusammenhang zu einer Steigerung der α -

Tocopherolkonzentrationen in Plasma und Leber. Die Lipidperoxidation im Plasma wurde reduziert. Hou et al. (2014) verwendeten eine Injektion mit Lipopolysacchariden als Induktor für oxidativen Stress in Ferkeln. Ampelopsin, ein Flavonoid, verbesserte in dieser Studie die antioxidative Kapazität im Plasma und reduzierte die MDA-Konzentrationen in der Leber. Ebenfalls eine Senkung der MDA-Konzentration im Plasma wurde durch Soja-Isoflavone in Jungsauen beobachtet, welche eine Zearalenon-Behandlung erfuhren (Wang et al. 2012). Zearalenon ist ein weit verbreitetes Mykotoxin, das oxidativen Stress hervorruft. Der Vergleich dieser Studien mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit und den Studien von Augustin et al. (2008) und Zhang et al. (2016) impliziert, dass Polyphenole das antioxidative System nur in Tieren verbessert, welche eine prooxidative oder proinflammatorische Behandlung erfahren, nicht aber in gesunden, unbehandelten Schweinen.

6.3 Einfluss von phytoenen Futterkomponenten auf den Fettstoffwechsel in der Leber beim Ferkel

Inflammation und ER-Stress in der Leber sind assoziiert mit einer gesteigerten Lipogenese, welche die Entwicklung einer Steatose begünstigt (Zhang et al. 2014; Inagaki 2015). Um diesen Pfad zu überprüfen, wurden Triglyceridkonzentrationen (TG) in Plasma und Leber bestimmt. Diese blieben von den polyphenolreichen Futterzusätzen unbeeinflusst. Das Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass auch die untersuchten stressresponsiven Signalwege durch die Supplementierung von Traubentrester und Hopfentreber unbeeinflusst blieben. Der Einsatz der ätherischen Öle wirkte sich hingegen senkend auf die TG-Konzentrationen in Leber und Plasma der Ferkel aus. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die verwendeten ätherischen Öle den Lipidmetabolismus beeinflussen. Dafür wurden Zielgene der Fettsäuresynthese, des PPAR α sowie des Carnitinstoffwechsels analysiert. PPAR α ist ein Transkriptionsfaktor, der den hepatischen Lipidstoffwechsel reguliert. PPAR α -Zielgene fördern die Fettsäureaufnahme, die Fettsäureoxidation und den Transport von Lipoproteinen. Der Triglyceridspiegel im Plasma wird durch eine PPAR α -Aktivierung gesenkt (Isseemann und Green 1990; Kersten et al. 2000; Willson et al. 2000; Berger und Moller 2002; Rakhshandehroo et al. 2010). Zur Verifizierung der Fettsäuresynthese wurden die Genexpressionen von SREBP-1c und ausgewählten Zielgenen dieses Proteins analysiert. SREBP-1c, in der

Gennomenklatur auch als SREBF1 bezeichnet, ist für die Modulation der Fettsäuresynthese in der Leber verantwortlich (Shimomura et al. 1997). Da die TG-Konzentrationen durch die Supplementierung der ätherischen Öle sowohl im Plasma als auch in der Leber gesenkt wurden, ergab sich die Erwartung einer reduzierten Fettsäuresynthese und einer erhöhten Transkription von PPAR α -Zielgenen bei den Tieren aus der Behandlungsgruppe. Die Zielgene der Fettsäuresynthese wurden durch den Zusatz der ätherischen Öle wider Erwarten nicht beeinflusst. Bei BBOX1 und SLC22A5, Zielgene des Carnitinstoffwechsels, traten ebenfalls keine Veränderungen im Expressionsverhalten durch die verwendeten ätherischen Öle auf. Der PPAR α -Signalweg wurde in geringem Umfang durch das getestete Produkt beeinflusst. Knapp ein Drittel der analysierten PPAR α -Zielgene wurden durch die orale Supplementierung des Produkts ätherischer Öle in ihrer Expressionsaktivität gehemmt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch mit einigen *in vitro* (Hotta et al. 2009; Katsukawa et al. 2010) und *in vivo* (Chung et al. 2010; Jing et al. 2013; Singh et al. 2013; Takahashi et al. 2013) Studien in Nagern. Hier wurden hypolipidämische Wirkungen über eine PPAR α -Aktivierung durch ätherische Öle erzielt. Das differenzierte Ergebnis kann auf den unterschiedlichen Versuchsmodellen beruhen. Bei den oben genannten *in vitro* Studien erfolgte eine additive LPS-Behandlung (Hotta et al. 2009; Katsukawa et al. 2010). Die Nager der *in vivo* Studien befanden sich in pathologischen Stoffwechsellagen. Chung et al. (2010) verwendeten Mäuse mit Typ 2 Diabetes. Die Tiere der anderen Studien erhielten eine fettreiche Diät, um Obesitas zu induzieren (Jing et al. 2013; Singh et al. 2013; Takahashi et al. 2013). Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit das ätherische Öle Produkt in gesunden, frisch abgesetzten Ferkeln getestet. Hinzu kommt, dass auch der ER-Stress durch die verwendeten ätherischen Öle eher eine Hemmung erfuhr. So wurde die Expression des FGF21 in der Leber durch den Einsatz der ätherischen Öle herunterreguliert. Eine Induktion des FGF21 kann sowohl im Rahmen der UPR als auch über PPAR α erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wies FGF21 keine gesteigerte Expression auf, sondern wurde im Gegensatz durch die Behandlung mit ätherischen Ölen sogar gehemmt. Bei genauerer Betrachtung der TG-Konzentrationen in Plasma und Leber fiel auf, dass sich die Reduktion dieser in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe auf einen einzigen Zeitpunkt beschränkte. Nur am Tag des Absetzens wurden die TG-Konzentrationen in der Leber und im Plasma der Ferkel durch die ätherischen Öle vermindert. Zu allen anderen Zeitpunkten bestand kein Konzentrationsunterschied der

Triglyceride zwischen den Kontroll- und den Behandlungstieren. Eine ähnliche Beobachtung machten Kong et al. (2007). Kong et al. (2007) untersuchten den Einfluss einer Mischung von chinesischen Kräutern unter anderem auf die Triglyceridkonzentrationen im Serum abgesetzter Ferkel. Der diätetische Zusatz bestand aus fünf chinesischen Kräutern, nämlich *Astragalus membranaceus* (Tragant), *Acanthopanax senticosus* (Borstige Taigawurzel), *Codonopsis pilosula* (Dangshen), *Crataegus pinnatifida* (Fiederblatt-Weißdorn) und *Salvia miltiorrhiza* (Rotwurzel-Salbei). Die Ferkel (Duroc x Landrace x Yorkshire) wurden mit 21 Lebenstagen abgesetzt und erhielten anschließend den Futterzusatz über einen Versuchszeitraum von vier Wochen. Die Triglyceridkonzentration im Serum war am ersten Zeitpunkt eine Woche nach dem Absetzen in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt. Auch die Behandlung mit Colistin, einem Antibiotikum, führte zu einer signifikanten Absenkung der Triglyceridkonzentration im Serum der Behandlungsgruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Aufgrund dessen suggerierten Kong et al. (2007) einen Zusammenhang zwischen dem intestinalen mikrobiellen Stoffwechsel und der Lipidhomöostase der Ferkel. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fettstoffwechsel in der Leber durch die Supplementierung der ätherischen Öle wenig beeinflusst. Die gesenkten Triglyceridkonzentrationen im Plasma und der Leber der Ferkel, die ätherische Öle supplementiert bekamen, im Vergleich zu den Kontrollferkeln scheinen deshalb auch bei der vorliegenden Arbeit auf einer lokalen antimikrobiellen Wirkung im Darm zu beruhen. Um dies bestätigen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig.

6.4 Einfluss des Absetzens auf Parameter der Stressantwort und des Fettstoffwechsels in der Leber beim Ferkel

Die Genexpressionsanalysen aller drei ausgewählten, stressresponsiven Signalwege in der Leber beim Ferkel wiesen signifikante Unterschiede über den Zeitverlauf auf. Zum Zeitpunkt null Tage nach dem Absetzen wurden bei allen drei Signalwegen niedrige Genexpressionsaktivitäten festgestellt. NF- κ B-Zielgene wurden drei Tage nach dem Absetzen am stärksten exprimiert. Die Genexpressionen des zytoprotektiven Nrf2-Signalweges nahmen im Zeitverlauf zu und erreichten 21 Tage nach dem Absetzen die höchsten Konzentrationen. Zielgene der UPR wurden durch

das Ferkelalter am wenigsten beeinflusst. Rund ein Drittel der analysierten Zielgene wiesen ebenfalls drei Tage nach dem Absetzen die höchsten relativen mRNA-Konzentrationen auf. Die erhobenen Daten zeigen, dass die Stimulation der Entzündungsantwort via NF- κ B und der ER-Stress kurz nach dem Absetzen am größten sind. Zeitverzögert erfolgt die Hochregulation antioxidativer, fremdstoffmetabolisierender und anderer zytoprotektiver Enzyme über den Nrf2-Signalweg. Auch Campbell et al. (2013) berichteten, dass die erste Woche unmittelbar nach dem Absetzen am stressigsten für die Ferkel sei. Inflammation und ER-Stress in der Leber sind in der Lage die Lipogenese zu steigern (Zhang et al. 2014; Inagaki 2015). Wie in 6.3 angesprochen wurde der hepatische Fettstoffwechsel zeitabhängig beeinflusst. Die Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber waren am Tag des Absetzens am höchsten und fielen bis zum Zeitpunkt 21 Tage nach dem Absetzen kontinuierlich ab. Die Fettsäuresynthese wurde von der Zeit gegenteilig beeinflusst. Die Expressionen der Fettsäuresynthese-Zielgene waren am Tag des Absetzens am niedrigsten und stiegen mit zunehmenden Ferkelalter an. Zielgene des PPAR α und der Carnitin-Biosynthese wurden drei Tage nach dem Absetzen am stärksten exprimiert. Zudem ließen sich 21 Tage nach dem Absetzen nochmals hohe relative mRNA-Konzentrationen messen. In der Literatur sind nur wenige Untersuchungen bezüglich Inflammation und Fettstoffwechsel nach dem Absetzen von Ferkeln mit einem genauen Zeitprotokoll zu finden. Andere Studien kamen jedoch zu ähnlichen Ergebnissen. Pié et al. (2003) stellten während der ersten zwei Tage nach dem Absetzen eine Hochregulation von IL-1 β , IL-6 und TNF- α mRNA im Dünndarm bei Ferkeln statt. Neben der Entzündungsantwort sind Imbalancen des antioxidativen Systems im Jejunum von Ferkeln nach dem Absetzen beschrieben. Die Genexpression antioxidativer Enzyme im Jejunum waren bei Yin et al. (2014) drei und fünf Tage nach dem Absetzen der Ferkel herabgesetzt. Des Weiteren war die nukleare Proteinkonzentration des Nrf2 im Jejunum drei und sieben Tage nach dem Absetzen im Vergleich zu null, ein und fünf Tage nach dem Absetzen erhöht. Die nukleare Konzentration von Nrf2 im Ileum zeigte einen gegenteiligen Effekt. Diese war fünf und sieben Tage nach dem Absetzen im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten verringert. Wie sich die nukleare Konzentration von Nrf2 im Ileum über einen längeren Zeitraum nach dem Absetzen entwickelt, ist aus der Studie leider nicht ersichtlich. Insgesamt scheint das Absetzen die Nrf2-Aktivität jedoch zunächst zu hemmen. Daneben sind nicht nur auf den Dünndarm lokalisierte Auswirkungen des Absetzens von Ferkeln

beschrieben, sondern auch systemische Folgen. In den ersten beiden Tagen nach dem Absetzen von Ferkeln finden sich im Plasma erhöhte IL-1- (McCracken et al. 1995) und Cortisolwerte (Moeser et al. 2006). Die Aktivität antioxidativer Enzyme im Plasma ist herabgesetzt. Yin et al. (2014) stellten eine Hemmung der SOD einen Tag und der Glutathionperoxidase (GSH-Px) drei Tage nach dem Absetzen von Ferkeln fest. Bei Zhu et al. (2012) war die SOD-Aktivität sieben Tage nach dem Absetzen von Ferkeln vermindert während die GSH-Px im Vergleich zur unabgesetzten Kontrollgruppe unbeeinflusst blieb. Einen weiteren Hinweis auf oxidativen Stress in den beiden oben genannten Studien bietet die MDA-Konzentration im Plasma als Marker für Lipidperoxidation. Diese war drei (Yin et al. 2014) bzw. 14 Tage (Zhu et al. 2012) nach dem Absetzen signifikant erhöht. Interessanterweise war die MDA-Konzentration bei Yin et al. (2014) sieben Tage nach dem Absetzen bereits wieder auf einem Level wie vor dem Absetzen wohingegen sie bei Zhu et al. (2012) zu diesem Zeitpunkt noch nicht erhöht war.

6.5 Einfluss von phytoenen Futterkomponenten auf die Leistungsparameter beim Ferkel

Der Einfluss polyphenolhaltiger Futterkomponenten auf Leistungsparameter bei abgesetzten Ferkeln ist wenig untersucht. Bei Gessner et al. (2013) verbesserte sich die *gain:feed ratio* (g Zunahme/kg Futteraufnahme) durch den Einsatz von 1 % Traubentrester in der Futtermischung signifikant. Wie die Veröffentlichung von Fiesel et al. (2014) bereits gezeigt hat, wurde die *gain:feed ratio* der abgesetzten Ferkel aus dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuch 1 durch den Zusatz von 1 % Hopfentreber signifikant und durch den Zusatz von 1 % Traubentrester in der Futtermischung tendenziell verbessert. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich geringe bis keine Effekte auf den Intermediärstoffwechsel beim Ferkel durch die phytoenen Futterzusätze. Die positive Beeinflussung der *gain:feed ratio* durch die Supplementierung von Traubentrester und Hopfentreber in Versuch 1 beruht daher nicht auf systemischen antioxidativen oder antiinflammatorischen Effekten, sondern vielmehr auf einer verbesserten Darmgesundheit der Ferkel, die Fiesel et al. (2014) festgestellt hatten. Während die tägliche Futteraufnahme durch die beiden polyphenolhaltigen Futterzusätze unberührt blieb, wirkte sich der Einsatz des Präparats mit ätherischen Ölen negativ auf die tägliche Futteraufnahme aus. Die Tiere

aus der Behandlungsgruppe nahmen signifikant weniger Futter auf als die Kontrolltiere. Dennoch erreichten die Tiere, die ätherische Öle supplementiert bekamen, die gleichen Endgewichte wie die Tiere der Kontrollgruppe. Daraus ergab sich eine gesteigerte *gain:feed ratio* der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Literatur sind sowohl positive als auch negative Effekte auf Leistungsdaten beim Ferkel durch den Futterzusatz von ätherischen Ölen beschrieben (Schöne 2003; Schöne et al. 2006; Janz et al. 2007; Franz et al. 2010; Zeng et al. 2015; Walia et al. 2017). Schöne (2003) kam zu dem Ergebnis, dass der Futteraufwand trotz unterschiedlicher Beeinflussung der anderen Leistungsdaten mehrheitlich durch den Einsatz ätherischer Öle verringert wird. Dies deckt sich mit der Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die Tiere aus der Behandlungsgruppe trotz einer geringeren Futteraufnahme als die Kontrolltiere die gleichen Körpergewichte wie diese erzielten.

6.6 Schlussfolgerung

Die im Versuch 1 getesteten polyphenolhaltigen Futterzusätze Traubentrester und Hopfentreber beeinflussten weder das Inflammationsgeschehen noch den antioxidativen Status in der Leber beim abgesetzten, gesunden Ferkel. Diese Ergebnisse weichen von Untersuchungen im Darmtrakt von Ferkeln ab. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass polyphenolhaltige Futterzusätze in Form von Traubentrester oder Hopfentreber eine antiinflammatorische Wirkung auf den Dünndarm ausüben (Gessner et al. 2013; Fiesel et al. 2014). Dies kann durch hohe lokale Konzentrationen der Polyphenole in den Enterozyten begründet sein. Denkbar ist ebenfalls ein sekundärer Effekt durch eine positive Beeinflussung der intestinalen Flora. Polyphenole weisen eine präbiotische Aktivität auf. Das Wachstum erwünschter Bakterien wird gefördert. Pathogene Bakterien werden gehemmt. Fiesel et al. (2014) beobachteten eine verbesserte *gain:feed ratio* durch den Einsatz der polyphenolhaltigen Futterzusätze. Dies kann nicht in einer systemischen Wirkung auf den Intermediärstoffwechsel in der Leber von Ferkeln zurückgeführt werden, sondern beruht vermutlich vielmehr auf der gesundheitsfördernden Wirkung von Traubentrester und Hopfentreber auf den Intestinaltrakt. Da Ferkel in der Phase des Absetzens anfällig für Erkrankungen des Darmtrakts sind (Pié et al. 2004), sind beide polyphenolhaltigen Futterzusätze aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung auf den Darmtrakt für den praktischen Einsatz empfehlenswert, obwohl keine systemische Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Das im Versuch 2 verwendete Produkt war reich an ätherischen Ölen und enthielt als Hauptkomponenten Carvacrol, Thymol und Limonen. Dieses Produkt hatte einen geringen Effekt auf stressresponsive Signalwege in der Leber. ER-Stress wurde auf Transkriptionsebene bei einem Drittel der gemessenen Zielgene reduziert. Auf Proteinebene blieb ein Effekt aus. Zur weiteren Verifizierung wurden Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Leber gemessen, da ER-Stress die Lipogenese in der Leber stimuliert (Hotamisligil 2010; Fu et al. 2012). Ein signifikanter Unterschied der TG-Konzentrationen trat zum Zeitpunkt des Absetzens auf. Die ätherischen Öle konnten die TG-Konzentrationen signifikant senken. Widersprüchlich dazu ist die verminderte PPAR α -Aktivität, die durch eine reduzierte Genexpression bei der Behandlungsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe von knapp einem Drittel der analysierten Zielgene festgestellt wurde. Die Aktivierung von PPAR α fördert eine

Triglyceridsenkung. Des Weiteren existieren erste Hinweise, dass PPAR α ER-Stress reduziert (Han et al. 2008; Tang et al. 2014) und durch ätherische Öle aktiviert werden kann (Katsukawa et al. 2010), was im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht. Die tägliche Futteraufnahme der Ferkel wurde durch den Zusatz der ätherischen Öle gesenkt. Dennoch erreichten die Behandlungstiere ähnliche Endgewichte wie die Kontrolltiere, was für eine verbesserte Futterverwertung spricht. Da auch dieses Produkt proinflammatorische NF- κ B-Zielgene in den Enterozyten herunterreguliert hat (unveröffentlichte Daten), ist seine praktische Anwendung ebenfalls sinnvoll, um Darmerkrankungen vorzubeugen.

Ein weiterer Aspekt des zweiten Ferkelversuchs war der Verlauf der erhobenen Parameter über einen Zeitraum von drei Wochen nach dem Absetzen. Die Beprobung fand an vier verschiedenen Zeitpunkten (null, drei, sieben und 21 Tage nach dem Absetzen) statt. Zielgene des inflammationsfördernden Transkriptionsfaktors NF- κ B und des ER-Stresses wurden kurz nach dem Absetzen am stärksten exprimiert. Zeitverzögert erfolgte die Hochregulation des zytoprotektiven Gegenspielers Nrf2. Zielgene des PPAR α und der Carnitin-Biosynthese wurden drei Tage nach dem Absetzen am stärksten exprimiert. Zudem wurden 21 Tage nach dem Absetzen nochmals hohe relative mRNA-Konzentrationen der Zielgene von PPAR α und der Carnitin-Biosynthese messen. Die Fettsäuresynthese, analysiert über Genexpressionsanalysen von Genen der Fettsäuresynthese, gewann mit zunehmenden Alter der Tiere an Bedeutung.

7 Zusammenfassung

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass polyphenolhaltige Futterkomponenten, Traubentrester und Hopfentreber, die Futterverwertung abgesetzter Ferkel verbessern und im Dünndarm antiinflammatorische Effekte erzielen. In der vorliegenden Arbeit wurde neben den beiden polyphenolhaltigen Futterzusätzen ein weiteres Präparat mit ätherischen Ölen getestet. Überprüft wurde die Hypothese, dass phyto gene Futterkomponenten den Intermediärstoffwechsel in der Leber positiv modulieren. Augenmerk lag auf stressresponsiven Signalwegen, antioxidativen Parametern und dem Lipidstoffwechsel. Seit dem 1. Januar 2006 ist der Einsatz von Antibiotika als Wachstumsförderer in Futtermitteln in der Europäischen Union verboten. Vor diesem Hintergrund ist es äußerst relevant, mögliche Alternativen zu finden, um die Leistungsdaten und die Tiergesundheit zu optimieren.

Der erste Ferkelversuch wurde mit 48 fünf Wochen alten Ferkeln der Kreuzungsrasse Piétrain x (deutsche Landrasse x deutsches Edelschwein) über vier Wochen durchgeführt. Die Kontrollgruppe erhielt die Futtergrundmischung ohne weitere Zusätze. Die Behandlungsgruppen bekamen die Futtergrundmischung mit dem Zusatz von 1 % Hopfentreber oder 1 % Traubentrester im Austausch gegen Weizen. Beim zweiten Ferkelversuch wurden 96 Ferkel der Kreuzungsrasse Piétrain x (deutsche Landrasse x deutsches Edelschwein) verwendet. Die Analysen wurden aus labortechnischen Gründen von 71 Tieren durchgeführt. Die Behandlungsgruppe erhielt ab ihrem sechsten Lebenstag ein Saugferkelbeifutter, dem 0,015 % des Präparats mit ätherischen Ölen beigemischt wurde. Nach dem Absetzen mit 21 Lebenstagen wurde das Präparat in der gleichen Konzentration als Bestandteil des Ferkelaufzuchtfutters weiterverwendet. Die Kontrollgruppe wurde lediglich mit der Futtergrundmischung versorgt. Die Probenentnahme erfolgte zu vier verschiedenen Zeitpunkten, nämlich am Tag des Absetzens sowie drei, sieben und 21 Tage danach.

Die Verifizierung der stressresponsiven Signalwege wurde bei beiden Versuchen in der Leber durchgeführt. Untersucht wurden auf Transkriptions- und Proteinebene die Signalwege des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors *nuclear factor-kappa B* (NF-κB), sein zytoprotektiver Gegenspieler *nuclear factor E2-related factor* (Nrf2) und die *unfolded protein response* (UPR), die infolge von ER-Stress auftritt. Die polyphenolhaltigen Futterkomponenten beeinflussten diese Signalwege in der Leber

nicht. Rund ein Drittel der UPR-Zielgene wurden durch die verwendeten ätherischen Öle gehemmt. Bei den Ferkeln des ersten Versuches wurde der antioxidative Status in Leber und Plasma erhoben. Die TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*), TEAC (*trolox equivalent antioxidant capacity*) und Tocopherol- sowie Retinolgehalte zeigten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen Traubentrester und Hopfentreber und der Kontrollgruppe. Des Weiteren blieben die Triglyceridkonzentrationen in Leber und Plasma durch Traubentrester und Hopfentreber unbeeinflusst. Ein Effekt wurde hier wiederum durch den Einsatz der ätherischen Öle hervorgerufen. Am Tag des Absetzens zeigten die Tiere, die das Präparat mit den ätherischen Ölen erhalten hatten, signifikant geringere TG-Werte in Plasma und Leber als die Kontrollgruppe. Da bereits beschrieben ist, dass ER-Stress die Lipogenese fördert und der ER-Stress sowie die TG-Werte durch die ätherischen Öle in den Ferkeln beeinflusst wurden, wurde der hepatische Lipidstoffwechsel bei diesem Versuch intensiver betrachtet. Expressionsanalysen von Zielgenen der Fettsäuresynthese lieferten kein Ergebnis bezüglich einer Beeinflussung durch ätherische Öle. Bei den *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α)- und Carnitinstoffwechselzielgenen wurde ein der Erwartungshaltung kontrastiertes Ergebnis erzielt. Aufgrund der verminderten TG-Werte am Absetztag bestand die Annahme, PPAR α könne zu diesem Zeitpunkt bei den Tieren der Behandlungsgruppe eine höhere Aktivität besitzen als bei den Kontrolltieren. Interessanterweise wurde bei rund einem Drittel der analysierten Zielgene jedoch eine verminderte Expressionsaktivität festgestellt. Der Einsatz der ätherischen Öle verringerte die relativen mRNA-Konzentrationen dieser PPAR α -Zielgene. Die Ursache dieses Effekts konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Hierfür sind genauere Kenntnisse über die komplexen Wechselwirkungen zahlreicher Signalwege und deren Interaktion mit phytogenen Futterkomponenten notwendig.

Insgesamt betrachtet wurde die aufgestellte Hypothese, dass phytogene Futterkomponenten den Intermediärstoffwechsel in Bezug auf das Entzündungsgeschehen, das antioxidative und zytoprotektive System, Stress im endoplasmatischen Retikulum und den Fettstoffwechsel in der Leber gesunder Ferkel positiv modulieren, nicht bestätigt.

8 Summary

Recent studies have shown that supplementation of plant products rich in polyphenols, particularly a grape seed and grape marc meal extract (GME) as well as spent hops (SH), improve the feed conversion of weaned piglets and exert antiinflammatory effects in the small intestine. Furthermore, a third feed supplement rich in essential oils was used in this work. It is hypothesized that phytogetic feed additives modulate the hepatic intermediate metabolism in a positive way. The focus was on stressresponsive signaling pathways, the antioxidative system and fat metabolism. In January 2006 the European Union implemented a full ban on in-feed antibiotics using in livestock diets as growth promoters. Viewed in this context, it is highly relevant to find alternative ways to improve performance data and animal health.

In the first experiment 48 crossbreed piglets were fed either with the supplement of 1 % grape seed and grape marc meal extract, 1 % spent hops for four weeks, or the nutritionally adequate diet only (control group). For the second experiment 96 crossbreed piglets were used. For reasons of laboratory research capacities, the analyses were carried out of 71 animals. The treatment group received supplementary food with 0,015 % of the product containing essential oils starting on their sixth day of life. After weaning on day 21, the treatment product was still used in the same concentration. The control group was fed with the nutritionally adequate diet only. The samples were collected at four different dates: at the day of weaning as well as three, seven, and 21 days afterwards.

Stress responsive signaling pathways were verified in both experiments on transcriptional and protein level. This was done by analyzing the signaling pathways of the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B), its cytoprotective counterpart nuclear factor E2-related factor (Nrf2), and the unfolded protein response (UPR), which occurs after ER stress. The polyphenolic compounds did not influence these pathways in the liver. ER stress was reduced marginally by the essential oils. From the piglets of the first experiment the antioxidative status in liver and plasma was examined. Concentrations of thiobarbituric acid-reactive substances, tocopherols and retinol, as well as the total antioxidant capacity in liver and plasma did not differ between the control and

the treatment groups. Furthermore, the content of triacylglycerols (TAG) in liver and plasma was unaffected by GME or SH in contrast to essential oils. On the day of weaning, piglets fed essential oils had significantly lower TAG-concentrations in liver and plasma as compared to the control group. ER stress improves the hepatic lipogenesis. Due to the previous results relating to ER stress and TAG concentrations, the lipid metabolism of these piglets was observed intensely. Expression analysis of several target genes involved in fatty acid synthesis showed no difference between the treatment and the control group. In case of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)- and carnitine metabolism target genes, the measured effect did not fit to remaining results. Due to low TAG-concentrations on the first date, the expectation was an improved PPAR α activity in the liver of piglets fed with essential oils. Surprisingly, the relative mRNA concentrations of, about one third of the measured PPAR α target genes had even decreased. The reason for this effect could not be explained within this work. To do so, deeper knowledge of the complex interrelationship between numerous pathways and their interaction with phytogetic feed supplements would have been necessary.

Overall, the hypothesis that phytogetic feed additives positively modulates the hepatic intermediate metabolism linked to inflammation, the antioxidant and cytoprotective system, stress of the endoplasmic reticulum and the lipid metabolism in healthy piglets was not confirmed.

9 Literaturverzeichnis

Abbott, B. D. (2009): Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR α), beta (PPAR β), and gamma (PPAR γ) in rodent and human development. In: *Reproductive Toxicology* 27 (3-4), S. 246–257.

Adachi, Y.; Yamamoto, K.; Okada, T.; Yoshida, H.; Harada, A.; Mori, K. (2008): ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. In: *Cell Structure and Function* 33, S. 75–89.

Ahner, A.; Brodsky, J. L. (2004): Checkpoints in ER-associated degradation: Excuse me, which way to the proteasome? In: *Trends in Cell Biology* 14 (9), S. 474–478.

Albini, A.; Dell'Eva, R.; Vene', R.; Ferrari, N.; Buhler, D. R.; Noonan, D. M.; Fassina, G. (2006): Mechanisms of the antiangiogenic activity by the hop flavonoid xanthohumol: NF- B and Akt as targets. In: *The FASEB Journal*, S. 527–529.

Amezcu, R.; Friendship, R. M.; Dewey, C. E.; Gyles, C.; Fairbrother, J. M. (2002): Presentation of postweaning Escherichia coli diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic E. coli serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. In: *Canadian Journal of Veterinary Research* 66, S. 73–78.

Andrade, J. M. O.; Paraiso, A. F.; Oliveira, M. V. ; Martins, A. M. E.; Neto, J. F.; Guimaraes, A. L. S. et al. (2014): Resveratrol attenuates hepatic steatosis in high-fat fed mice by decreasing lipogenesis and inflammation. In: *Nutrition* 30 (7-8), S. 915–919.

Arenzana-Seisdedos, F.; Thompson, J.; Rodriguez, M. S.; Bachelier, F.; Thomas, D.; Hay, R. T. (1995): Inducible Nuclear Expression of Newly Synthesized IkappaBalpha Negatively Regulates DNA-Binding and Transcriptional Activities of NF-kappaB. In: *Molecular and Cellular Biology* 15, S. 2689–2696.

Arvind, S. R.; Vyas, P. (2013): Essential oils from plants: a review. In: *International Journal of Chemtech Applications Vol. 2*, S. 129–134.

Auger, C.; Gérain, P.; Laurent-Bichon, F.; Portet, K.; Bornet, A.; Caporiccio, B. et al. (2004): Phenolics from Commercialized Grape Extracts Prevent Early Atherosclerotic

Lesions in Hamsters by Mechanisms Other than Antioxidant Effect. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (16), S. 5297–5302.

Augustin, K.; Blank, R.; Boesch-Saadatmandi, C.; Frank, J.; Wolffram, S.; Rimbach, G. (2008): Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (6), S. 705–711.

Axling, U.; Olsson, C.; Xu, J.; Fernandez, C.; Larsson, S.; Ström, K. et al. (2012): Green tea powder and *Lactobacillus plantarum* affect gut microbiota, lipid metabolism and inflammation in high-fat fed C57BL/6J mice. In: *Nutrition & metabolism* 9 (1), 105.

Baar, R. A.; Dingfelder, C. S.; Smith, L. A.; Bernlohr, D. A.; Wu, C.; Lange, A. J.; Parks, E. J. (2005): Investigation of in vivo fatty acid metabolism in AFABP/aP2(-/-) mice. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 288 (1), E187-E193.

Badman, M. K.; Pissios, P.; Kennedy, A. R.; Koukos, G.; Flier, J. S.; Maratos-Flier, E. (2007): Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. In: *Cell Metabolism* 5 (6), S. 426–437.

Bai, D.; Ueno, L.; Vogt, P. K. (2009): Akt-mediated regulation of NFκB and the essentialness of NFκB for the oncogenicity of PI3K and Akt. In: *International Journal of Cancer* 125 (12), S. 2863–2870.

Baird, L.; Dinkova-Kostova, A. T. (2011): The cytoprotective role of the Keap1–Nrf2 pathway. In: *Archives of Toxicology* 85 (4), S. 241–272.

Bak, M.; Jun, M.; Jeong, W. (2012): Procyanidins from Wild Grape (*Vitis amurensis*) Seeds Regulate ARE-Mediated Enzyme Expression via Nrf2 Coupled with p38 and PI3K/Akt Pathway in HepG2 Cells. In: *International Journal of Molecular Sciences* 13 (12), S. 801–818.

Baltimore, D. (2011): NF-κB is 25. In: *Nature Immunology* 12 (8), S. 683–685.

Barnes, P. J. (1997): Nuclear factor- κ B. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29 (6), S. 867–870.

Başer, K. H. C.; Demirci, F. (2007): Chemistry of Essential Oils. In: *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*, edited by Berger RG. New York; Springer, S. 43–86.

Berger, J.; Moller, D. E. (2002): The Mechanisms of Action of PPARs. In: *Annual Review of Medicine*, vol. 53, S. 409–435.

Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Hendershot, L. M.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. In: *Nature Cell Biology* 2, S. 326–332.

Betancor-Fernandez, A.; Sies, H.; Stahl, W.; Cristina Polidori, M. (2002): In Vitro Antioxidant Activity of 2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (α -CEHC), a Vitamin E Metabolite. In: *Free Radical Research* 36 (8), S. 915–921.

Bieger, J.; Cermak, R.; Blank, R.; Boer, V. C. de; Hollman, P. C.; Kamphues, J. (2008): Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. In: *Journal of Nutrition* 138, S. 1417–1420.

Bieri, F.; Lhuguenot, J. C. (1993): Toxicity of peroxisome proliferators. In: *Biochimie* 75, S. 263–268.

Bogaert, S.; Vos, M.; Olievier, K.; Peeters, H.; Elewaut, D.; Lambrecht, B. et al. (2011): Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress in Inflammatory Bowel Disease: A Different Implication for Colonic and Ileal Disease? In: *PLoS ONE* 6 (10), e25589.

Bohuslav, J.; Kravchenko, V.; Parry, G.; Erlich, J.; Gerondakis, S.; Mackman, N.; Ulevitch, R. (1998): Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF- κ B. In: *Journal of Clinical Investigation* 102, S. 1645–1652.

Bonizzi, G.; Bebień, M.; Otero, D.; Johnson-Vroom, K.; Cao, Y. et al. (2004): Activation of IKK target genes depends on recognition of specific κ B binding sites by RelB:p52 dimers. In: *Embo Journal* 23, S. 4202–4210.

- Bonizzi, G.; Karin, M. (2004): The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. In: *Trends in Immunology* 25 (6), S. 280–288.
- Bosscher, K. de; Vanden Berghe, W.; Haegeman, G. (2006): Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor κ B. In: *Oncogene* 25 (51), S. 6868–6886.
- Boudry, G.; Peron, V.; Le Huerou-Luron, I.; Lalles, J. P.; Sève, B. (2004): Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. In: *Journal of Nutrition* 134, S. 2256–2262.
- Braissant, O.; Foufelle, F.; Scotto, C.; Dauca, M.; Wahli, W. (1996): Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. In: *Endocrinology* 137, S. 354–366.
- Bremner, P.; Tang, S.; Birkmayer, H.; Fiebich, B. L.; Muñoz, E.; Marquez, N. et al. (2004): Phenylpropanoid NF- κ B inhibitors from *Bupleurum fruticosum*. In: *Planta Medica* 70 (10), S. 914–918.
- Brenes, A.; Roura, E. (2010): Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. In: *Animal Feed Science and Technology* 158 (1-2), S. 1–14.
- Brown, J. D.; Plutzky, J. (2007): Peroxisome Proliferator Activated Receptors as Transcriptional Nodal Points and Therapeutic Targets. In: *Circulation* 115 (4), S. 518–533.
- Buelna-Chontal, M.; Zazueta, C. (2013): Redox activation of Nrf2 & NF- κ B: A double end sword? In: *Cellular Signalling* 25 (12), S. 2548–2557.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. In: *International Journal of Food Microbiology* 94 (3), S. 223–253.
- Burton, G. W.; Ingold, K. U. (1986): Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. In: *Accounts of Chemical Research* 19, S. 194–201.
- Burton, G. W.; Joyce, A.; Ingold, K. U. (1982): First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. In: *Lancet* 2, S. 327.

- Calton, M.; Zeng, H.; Urano, F.; Till, J. H.; Hubbard, S. R.; Harding, H. P. et al. (2002a): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. In: *Nature* 415 (6867), S. 92–96.
- Calton, M.; Zeng, H.; Urano, F.; Till, J. H.; Hubbard, S. R.; Harding, H. P. et al. (2002b): IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. In: *Nature* 415 (6867), S. 92–96.
- Campbell, J. M.; Crenshaw, J. D.; Polo, J. (2013): The biological stress of early weaned piglets. In: *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4 (19), S. 1–4.
- Candan, F.; Unlu, M.; Tepe, B.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sökmen, A.; Akpulat, H. (2003): Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). In: *Journal of Ethnopharmacology* 87 (2-3), S. 215–220.
- Canning, P.; Cooper, C. D. O.; Krojer, T.; Murray, J. W.; Pike, A. C. W.; Chaikuad, A. et al. (2013): Structural Basis for Cul3 Protein Assembly with the BTB-Kelch Family of E3 Ubiquitin Ligases. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (11), S. 7803–7814.
- Ceh, B.; Kac, M.; Košir, I. J.; Abram, V. (2007): Relationships between Xanthohumol and Polyphenol Content in Hop Leaves and Hop Cones with Regard to Water Supply and Cultivar. In: *International Journal of Molecular Sciences* 8 (9), S. 989–1000.
- Chainy, G.B.N.; Manna, S. K.; Chaturvedi, M. M.; Aggarwal, B. B. (2000): Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- κ B, AP-1 JNK, MAPKK and apoptosis. In: *Oncogene* 19, S. 2943–2950.
- Chaudhari, N.; Talwar, P.; Parimisetty, A.; Lefebvre dâ Hellencourt, C.; Ramanan, P. (2014): A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (Suppl), 213.
- Chen, C.; Pung, D.; Leong, V.; Hebbar, V.; Shen, G.; Nair, S. et al. (2004): Induction of detoxifying enzymes by garlic organosulfur compounds through transcription factor Nrf2: effect of chemical structure and stress signals. In: *Free Radical Biology and Medicine* 37 (10), S. 1578–1590.

- Chen, X. L.; Dodd, G.; Thomas, S.; Zhang, X.; Wasserman, M. A.; Rovin, B. H.; Kunsch, C. (2006): Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. In: *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 290 (5), H1862-H1870.
- Cheyrier, V. (2005): Polyphenols in foods are more complex than often thought. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 223S–229S.
- China, R.; Mukherjee, S.; Sen, S.; Bose, S.; Datta, S.; Koley, H. et al. (2012): Antimicrobial activity of *Sesbania grandiflora* flower polyphenol extracts on some pathogenic bacteria and growth stimulatory effect on the probiotic organism *Lactobacillus acidophilus*. In: *Microbiological research* 167 (8), S. 500–506.
- Christen, V.; Meili, N.; Fent, K. (2013): Microcystin-LR Induces Endoplasmatic Reticulum Stress and Leads to Induction of NFκB, Interferon-Alpha, and Tumor Necrosis Factor-Alpha. In: *Environmental Science & Technology*, S. 3378–3385.
- Chung, M. J.; Cho, S. Y.; Bhuiyan, M. J. H.; Kim, K. H.; Lee, S. J. (2010): Anti-diabetic effects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. In: *British Journal of Nutrition* 104 (02), S. 180–188.
- Cnop, M.; Foufelle, F.; Velloso, L. A. (2012): Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. In: *Trends in Molecular Medicine* 18 (1), S. 59–68.
- Contreras, A. V.; Torres, N.; Tovar, A. R. (2013): PPAR- as a Key Nutritional and Environmental Sensor for Metabolic Adaptation. In: *Advances in Nutrition: An International Review Journal* 4 (4), S. 439–452.
- Cox, J. S.; Shamu, C. E.; Walter, P. (1993): Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. In: *Cell* 73 (6), S. 1197–1206.
- Cox, J. S.; Walter, P. (1996): A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. In: *Cell* 87 (3), S. 391–404.

Crompton, M. (1999): The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. In: *Biochemical Journal* 341, S. 233–249.

Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. (2006): Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet, Chapter 1*.

Cullinan, S. B.; Gordan, J. D.; Jin, J.; Harper, J. W.; Diehl, J. A. (2004): The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase- oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (19), S. 8477–8486.

Cullinan, S. B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvisais, E.; Kaufman, R. J.; Diehl, J. A. (2003): Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. In: *Molecular and Cellular Biology* 23, S. 7198–7209.

Cullinan, S. B.; Diehl, J. A. (2006): Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (3), S. 317–332.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. (2007): Polyphenols, dietary sources and bioavailability. In: *Ann Ist Super Sanità, Vol. 43, No. 4*, S. 348–361.

Dandlen, S. A.; Lima, A. S.; Mendes, M. D.; Miguel, M. G.; Faleiro, M.L; Sousa, M. J. et al. (2010): Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. In: *Flavour and Fragrance Journal* 25, S. 150–155.

Dejardin, E.; Droin, N.; Delhase, M.; Haas, E.; Cao, Y.; Makris, C. et al. (2002): The lymphotoxin-b receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kB pathways. In: *Immunity* 17, S. 525–535.

Delerive, P.; Bosscher, K. de; Besnard, S.; Vanden Berghe, W.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J. et al. (1999): Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha Negatively Regulates the Vascular Inflammatory Gene Response by Negative Cross-talk with Transcription Factors NF-kB and AP-1. In: *The journal of biological chemistry, vol. 274, no. 45*, S. 32048–32054.

Delerive, P.; Bosscher, K. de; Vanden Berghe, W.; Fruchart, J. C.; Haegeman, G.; Staels, B. (2002): DNA Binding-Independent Induction of I κ B α Gene Transcription by PPAR α . In: *Molecular Endocrinology* 16 (5), S. 1029–1039.

Delerive, P.; Fruchart, J. C.; Staels, B. (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. In: *Journal of Endocrinology* 169, S. 453–459.

Delerive, P.; Gervois, P.; Fruchart, J.-C.; Staels, B. (2000): Induction of I B Expression as a Mechanism Contributing to the Anti-inflammatory Activities of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- Activators. In: *Journal of Biological Chemistry* 275 (47), S. 36703–36707.

Deng, J.; Lu, P. D.; Zhang, Y.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Sonenberg, N. et al. (2004): Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. In: *Molecular and Cellular Biology* 24, S. 10161–10168.

Desvergne, B.; Wahli, W. (1999): Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. In: *Endocrine Reviews*, vol. 20, no. 5, S. 649–688.

Devchand, P. R.; Keller, H.; Peters, J. M.; Vazquez, M.; Gonzalez, F. J.; Wahli, W. (1996): The PPAR α -leukotriene B₄ pathway to inflammation control. In: *Nature*, vol. 384, no. 6604, S. 39–43.

Dietz, B. M.; Hagos, G. K.; Eskra, J. N.; Wijewickrama, G. T.; Anderson, J. R.; Nikolic, D. et al. (2013): Differential regulation of detoxification enzymes in hepatic and mammary tissue by hops (*Humulus lupulus*) in vitro and in vivo. In: *Molecular nutrition & food research* 57 (6), S. 1055–1066.

Dietz, B. M.; Kang, Y. H.; Liu, G.; Eggler, A. L.; Yao, P.; Chadwick, L. R. et al. (2005): Xanthohumol Isolated from *Humulus lupulus* Inhibits Menadione-Induced DNA Damage through Induction of Quinone Reductase. In: *Chemical Research in Toxicology* 18 (8), S. 1296–1305.

Digaleh, H.; Kiaei, M.; Khodagholi, F. (2013): Nrf2 and Nrf1 signaling and ER stress crosstalk: implication for proteasomal degradation and autophagy. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (24), S. 4681–4694.

Dillard, C. J.; German, J. B. (2000): Phytochemicals: nutraceuticals and human health. In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, S. 1744–1756.

Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y. et al. (2002): Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (18), S. 11908–11913.

Dorn, C.; Heilmann, J.; Hellerbrand, C. (2012): Protective effect of xanthohumol on toxin-induced liver inflammation and fibrosis. In: *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 5 (1), S. 29–36.

Dreyer, C.; Krey, G.; Keller, H.; Givel, F.; Helftenbein, G.; Wahli, W. (1992): Control of the peroxisomal β -oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. In: *Cell* 68 (5), S. 879–887.

Dudareva, N.; Negre, F.; Nagegowda, D. A.; Orlova, I. (2006): Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. In: *Critical Reviews in Plant Sciences* 25 (5), S. 417–440.

Dufey, E.; Sepulveda, D.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. (2014): Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. In: *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 307 (7), C582-C594.

Eder, K.; Ringseis, R. (2010): The role of peroxisome proliferator-activated receptor α in transcriptional regulation of novel organic cation transporters. In: *European Journal of Pharmacology* 628 (1-3), S. 1–5.

Edris, A. E. (2007): Pharmaceutical and therapeutic Potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. In: *Phytotherapy Research* 21 (4), S. 308–323.

El Abed, N.; Kaabi, B.; Smaali, M. I.; Chabbouh, M.; Habibi, K.; Mejri, M. et al. (2014): Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. In: *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014 (30), S. 1–11.

El Gharras, H. (2009): Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. In: *International Journal of Food Science & Technology* 44 (12), S. 2512–2518.

Epstein, F. H.; Barnes, P. J.; Karin, M. (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. In: *New England Journal of Medicine* 336 (15), S. 1066–1071.

Eri, S.; Khoo, B. K.; Lech, J.; Hartman, T. G. (2000): Direct Thermal Desorption–Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Profiling of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils in Support of Varietal Characterization. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 48 (4), S. 1140–1149.

Etxeberria, U.; Arias, N.; Boqué, N.; Macarulla, M. T.; Portillo, M. P.; Martínez, J. A.; Milagro, F. I. (2015): Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26 (6), S. 651–660.

Etxeberria, U.; Fernández-Quintela, A.; Milagro, F. I.; Aguirre, L.; Martínez, J. A.; Portillo, M. P. (2013): Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (40), S. 9517–9533.

Evans, R. M.; Barish, G. D.; Wang, Y. X. (2004): PPARs and the complex journey to obesity. In: *Nature Medicine* 10 (4), S. 355–361.

Faria, A.; Fernandes, I.; Norberto, S.; Mateus, N.; Calhau, C. (2014): Interplay between anthocyanins and gut microbiota. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (29), S. 6898–6902.

Farombi, E. Olatunde; Shrotriya, Sangeeta; Na, Hye-Kyung; Kim, Sung-Hoon; Surh, Young-Joon (2008): Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. In: *Food and Chemical Toxicology* 46 (4), S. 1279–1287.

Faustman, D. Davis, M. (2010): TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. In: *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (6), S. 482–493.

Federoff, N. (2006): Redox Regulatory Mechanisms in Cellular Stress Responses. In: *Annals of Botany* 98 (2), S. 289–300.

Fenton, J. P.; Roehrig, K. L.; Mahan, D. C.; Corley, J. R. (1985): Effect of swine weaning age on body fat and lipogenic activity in liver and adipose tissue. In: *Journal of Animal Science*, vol. 60, no. 1, S. 190–199.

Ferré, P. (2004): The Biology of Peroxisome Proliferator–Activated Receptors. Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. In: *Diabetes*, Vol. 53, S43–S50.

Fiesel, A.; Gessner, D. K.; Most, E.; Eder, K. (2014): Effects of dietary polyphenol-rich plant products from grape or hop on pro-inflammatory gene expression in the intestine, nutrient digestibility and faecal microbiota of weaned pigs. In: *BMC Veterinary Research* 10 (1), 196.

Forman, B. M.; Chen, J.; Evans, R. M. (1997): Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 9, S. 4312–4317.

Franz, C.; Baser, K.; Windisch, W. (2010): Essential oils and aromatic plants in animal feeding a European perspective. A review. In: *Flavour and Fragrance Journal* (25), S. 327–340.

Fu, S.; Watkins, S. M.; Hotamisligil, G. S. (2012): The Role of Endoplasmic Reticulum in Hepatic Lipid Homeostasis and Stress Signaling. In: *Cell Metabolism* 15 (5), S. 623–634.

Funk, J. L.; Frye, J. B.; Oyarzo, J. N.; Chen, J.; Zhang, H.; Timmermann, B. N. (2016): Anti-Inflammatory Effects of the Essential Oils of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in Experimental Rheumatoid Arthritis. In: *PharmaNutrition* 4 (3), S. 123–131.

Furusawa, Y.; Uruno, A.; Yagishita, Y.; Higashi, C.; Yamamoto, M. (2014): Nrf2 induces fibroblast growth factor 21 in diabetic mice. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 19 (12), S. 864–878.

Gessner, D. K.; Bonarius, M.; Most, E.; Fiesel, A.; Eder, K. (2016): Effects of polyphenol-rich plant products from grape or hop as feed supplements on the expression of inflammatory, antioxidative, cytoprotective and endoplasmic reticulum stress-related genes and the antioxidative status in the liver of piglets. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, S. 1–10.

Gessner, D. K.; Ringseis, R.; Siebers, M.; Keller, J.; Kloster, J.; Wen, G.; Eder, K. (2012): Inhibition of the pro-inflammatory NF- κ B pathway by a grape seed and grape marc meal extract in intestinal epithelial cells. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 (6), S. 1074–1083.

Gessner, D. K.; Fiesel, A.; Most, E.; Dinges, J.; Wen, G.; Ringseis, R.; Eder, K. (2013): Supplementation of a grape seed and grape marc meal extract decreases activities of the oxidative stress-responsive transcription factors NF- κ B and Nrf2 in the duodenal mucosa of pigs. In: *Acta Veterinaria Scandinavica* 55 (1), 18.

Gessner, D.K.; Schlegel, G.; Ringseis, R.; Schwarz, F. J.; Eder, K. (2014): Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. In: *BMC Veterinary Research* 10 (1), 46.

Ghosh, S.; Karin, M. (2002): Missing pieces in the NF- κ B puzzle. In: *Cell* 109 (2), S. 81–96.

Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. (1998): NF- κ B and Rel proteins: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. In: *Annual Review of Immunology* 16 (1), S. 225–260.

Gilmore, T. D. (2006): Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. In: *Oncogene* 25 (51), S. 6680–6684.

Gilmore, Thomas D. (1990): NF- κ B, KBF1, dorsal, and related matters. In: *Cell* 62 (5), S. 841–843.

Gloire, G.; Legrand-Poels, S.; Piette, J. (2006): NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. In: *Biochemical Pharmacology* 72 (11), S. 1493–1505.

Gomez-Samano, M. A.; Grajales-Gomez, M.; Zuarth-Vazquez, J. M.; Navarro-Flores, M. F.; Martinez-Saavedra, M.; Juarez-Leon, O. A. et al. (2016): Fibroblast growth factor 21 and its novel association with oxidative stress. In: *Redox biology* 11, S. 335–341.

Gottlicher, M.; Widmark, E.; Li, Q.; Gustafsson J. A. (1992): Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, S. 4653–4657.

Ha, J.-H.; Shil, P. K.; Zhu, P.; Gu, L.; Li, Q.; Chung, S. (2014): Ocular Inflammation and Endoplasmic Reticulum Stress Are Attenuated by Supplementation with Grape Polyphenols in Human Retinal Pigmented Epithelium Cells and in C57BL/6 Mice. In: *Journal of Nutrition* 144 (6), S. 799–806.

Han, K. L.; Choi, J. S.; Lee, J. Y.; Song, J.; Joe, M. K.; Jung, M. H.; Hwang, J.-K. (2008): Therapeutic Potential of Peroxisome Proliferators-Activated Receptor- / Dual Agonist With Alleviation of Endoplasmic Reticulum Stress for the Treatment of Diabetes. In: *Diabetes* 57 (3), S. 737–745.

Han, X.; Shen, T.; Lou, H. (2007): Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. In: *International Journal of Molecular Sciences* 8, S. 950–988.

Harding, H. P.; Novoa, I.; Zhang, Y.; Zeng, H.; Wek, R.; Schapira, M.; Ron, D. (2000): Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. In: *Molecular Cell* 6 (5), S. 1099–1108.

Harding, H. P.; Zhang, Y.; Ron, D. (1999): Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. In: *Nature* 397 (6716), S. 271–274.

Harikumar, K. B.; Kunnumakkara, A. B.; Ahn, K. S.; Anand, P.; Krishnan, S.; Guha, S.; Aggarwal, B. B. (2009): Modification of the cysteine residues in I B kinase and NF- B (p65) by xanthohumol leads to suppression of NF- B-regulated gene products and potentiation of apoptosis in leukemia cells. In: *Blood* 113 (9), S. 2003–2013.

Hayashi, T. Saito, A.; Okuno, S.; Ferrand-Drake, M.; Dodd, R. L.; Nishi, T. et al. (2003): Oxidative Damage to the Endoplasmic Reticulum is Implicated in Ischemic

Neuronal Cell Death. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, S. 1117–1128.

Hayden, M. S.; Ghosh, S. (2004): Signaling to NF-kappaB. In: *Genes & Development* 18, S. 2195–2224.

Haze, K.; Okada, T.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Negishi, M.; Mori, K. (2001): Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. In: *Biochemical Journal* 355 (1), S. 19–28.

Haze, K.; Yoshida, H.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1999): Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. In: *Molecular Biology of the Cell* 10, S. 3787–3799.

He, C. H.; Gong, P.; Hu, B.; Stewart, D.; Choi, M. E.; Choi, A. M. K.; Alam, J. (2001): Identification of Activating Transcription Factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting Protein: IMPLICATION FOR HEME OXYGENASE-1 GENE REGULATION. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (24), S. 20858–20865.

He, Q.; Tang, H.; Ren, P.; Kong, X.; Wu, G.; Yin, Y.; Wang, Y. (2011): Dietary Supplementation with L-Arginine Partially Counteracts Serum Metabonome Induced by Weaning Stress in Piglets. In: *Journal of Proteome Research* 10 (11), S. 5214–5221.

Helke, K. L.; Swindle, M. M. (2013): Animal models of toxicology testing: the role of pigs. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 9 (2), S. 127–139.

Henkel, T.; Zabel, U.; van Zee, K.; Müller, J. M.; Fanning, E.; Baeuerle, P. A. (1992): Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-κB subunit. In: *Cell* 68 (6), S. 1121–1133.

Heo, J. M.; Opapeju, F. O.; Pluske, J. R.; Kim, J. C.; Hampson, D. J.; Nyachoti, C. M. (2013): Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial

compounds. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97 (2), S. 207–237.

Hernández-Jiménez, A.; Gómez-Plaza, E.; Martínez-Cutillas, A.; Kennedy, J. A. (2009): Grape Skin and Seed Proanthocyanidins from Monastrell × Syrah Grapes. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 57 (22), S. 10798–10803.

Hetz, C. (2012): The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, S 89–102.

Hinnebusch, A. G. (1994): The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. In: *Semin. Cell Biol.* 5, S. 417–426.

Holden, P. R.; Tugwood, J. D. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha: role in rodent liver cancer and species differences. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 22, S. 1–8.

Hotamisligil, G. S. (2010): Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. In: *Cell* 140 (6), S. 900–917.

Hotta, M.; Nakata, R.; Katsukawa, M.; Hori, K.; Takahashi, S.; Inoue, H. (2009): Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPAR and suppresses COX-2 expression. In: *The Journal of Lipid Research* 51 (1), S. 132–139.

Hou, X.; Zhang, J.; Ahmad, H.; Zhang, H.; Xu, Z.; Wang, T. (2014): Evaluation of antioxidant activities of ampelopsin and its protective effect in lipopolysaccharide-induced oxidative stress piglets. In: *PLoS ONE* 9 (9), e108314.

Hu, P.; Han, Z.; Couvillon, A. D.; Kaufman, R. J.; Exton, J. H. (2006): Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1a-mediated NF-kB activation and downregulation of TRAF2 expression. In: *Molecular and Cellular Biology* 26, S. 3071–3084.

Huang, H. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. (2000): Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12475–12480.

Huang, H. C.; Nguyen, T.; Pickett, C. B. (2002): Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (45), S. 42769–42774.

Hume, M. E. (2011): Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. In: *Poultry Science* 90 (11), S. 2663–2669.

Ijpenberg, A.; Jeannin, E.; Wahli, W.; Desvergne, B. (1997): Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. In: *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 32, S. 20108–20117.

Inagaki, T. (2015): Research Perspectives on the Regulation and Physiological Functions of FGF21 and its Association with NAFLD. In: *Frontiers in endocrinology* 6, 147.

Inagaki, T.; Dutchak, P.; Zhao, G.; Ding, X.; Gautron, L.; Parameswara, V. et al. (2007): Endocrine regulation of the fasting response by PPAR α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. In: *Cell Metabolism* 5 (6), S. 415–425.

Issemann, I.; Green, S. (1990): Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. In: *Nature*, vol. 347, no. 6294, S. 645–650.

Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y. et al. (1997): An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. In: *Biochem Biophys Res Commun* 236 (2), S. 313–322.

Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (1999): Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. In: *Genes & Development* 13 (1), S. 76–86.

Izumiya, Y.; Bina, H. A.; Ouchi, N.; Akasaki, Y.; Kharitonov, A.; Walsh, K. (2008): FGF21 is an Akt-regulated myokine. In: *FEBS letters* 582 (27), S. 3805–3810.

Jain, A. K. (2005): Nuclear Import and Export Signals in Control of Nrf2. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (32), S. 29158–29168.

Janz, J. A. M.; Morel, P. C. H.; Wilkinson, B. H. P.; Purchas, R. W. (2007): Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. In: *Meat science* 75 (2), S. 350–355.

Jeon, W. K.; Hong, H. Y.; Kim, B. C. (2011): Genipin up-regulates heme oxygenase-1 via PI3-kinase-JNK1/2-Nrf2 signaling pathway to enhance the anti-inflammatory capacity in RAW264.7 macrophages. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 512 (2), S. 119–125.

Jeong, W. S.; Kim, I. W.; Hu, R.; Kong, A. N. (2004): Modulatory Properties of Various Natural Chemopreventive Agents on the Activation of NF- κ B Signaling Pathway. In: *Pharmaceutical Research* 21, S. 661–670.

Jiang, H. Y.; Wek, S. A.; McGrath, B. C.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J.; Cavener, D. R.; Wek, R. C. (2003): Phosphorylation of the α subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF- κ B in response to diverse cellular stresses. In: *Molecular and Cellular Biology* 23, S. 5651–5663.

Jin, W.; Wang, H.; Yan, W.; Xu, L.; Wang, X.; Zhao, X. et al. (2008): Disruption of Nrf2 Enhances Upregulation of Nuclear Factor- κ B Activity, Proinflammatory Cytokines, and Intercellular Adhesion Molecule-1 in the Brain after Traumatic Brain Injury. In: *Mediators of Inflammation* 2008 (2), S. 1–7.

Jing, L.; Zhang, Y.; Fan, S.; Gu, M.; Guan, Y.; Lu, X. et al. (2013): Preventive and ameliorating effects of citrus d-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. In: *European Journal of Pharmacology* 715 (1-3), S. 46–55.

Jousse, C.; Oyadomari, S.; Novoa, I.; Lu, P.; Zhang, Y.; Harding, H. P.; Ron, D. (2003): Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2 phosphatase, CReP, promotes survival of stressed cells. In: *The Journal of Cell Biology* 163 (4), S. 767–775.

Kamal-Eldin, A.; Appelqvist, L. A. (1996): The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. In: *Lipids* 31, S. 671–701.

Kaneko, M.; Niinuma, Y.; Nomura, Y. (2003): Activation signal of nuclear factor- κ B in response to endoplasmic reticulum stress is transduced via IRE1 and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. In: *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26, S. 931–935.

Kang, K. W.; Cho, I. J.; Lee, C. H.; Kim, S. G. (2003): Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent CCAAT/enhancer binding protein beta activation in the induction of glutathione S-transferase by oltipraz. In: *Journal of the National Cancer Institute* 95 (1), S. 53–66.

Kang, K. W.; Lee, S. J.; Park, J. W.; Kim, S. G. (2002): Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. In: *Molecular Pharmacology* 62 (5), S. 1001–1010.

Kang, M. I.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, N.; Kim, S. G.; Yamamoto, M. (2004): Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. In: *The National Academy of Sciences of the USA*, S. 2046–2051.

Karin, M.; Ben-Neriah, Y. (2000): Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. In: *Annual Review of Immunology* 18 (1), S. 621–663.

Kato, Y.; Itoh, K.; Yoshida, E.; Miyagishi, M.; Fukamizu, A.; Yamamoto, M. (2001): Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. In: *Genes Cells* 6, S. 857–868.

Katsukawa, M.; Nakata, R.; Takizawa, Y.; Hori, K.; Takahashi, S.; Inoue, H. (2010): Citral, a component of lemongrass oil, activates PPAR α and γ and suppresses COX-2 expression. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801 (11), S. 1214–1220.

Kaufman, R. J. (1999): Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. In: *Genes & Development* 13 (10), S. 1211–1233.

Kensler, T. W.; Wakabayashi, N. (2010): Nrf2: friend or foe for chemoprevention? In: *Carcinogenesis* 31 (1), S. 90–99.

Kersten, S.; Desvergne, B.; Wahli, W. (2000): Roles of PPARs in health and disease. In: *Nature*, vol. 405, no. 6785, S. 421–424.

Kersten, S.; Seydoux, J.; Peters, J. M.; Gonzalez, F. J.; Desvergne, B.; Wahli, W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. In: *Journal of Clinical Investigation* 103, S. 1489–1498.

Kim, D. K.; Jeong, S. C.; Gorinstein, S.; Chon, S. U. (2012): Total Polyphenols, Antioxidant and Antiproliferative Activities of Different Extracts in Mungbean Seeds and Sprouts. In: *Plant Foods for Human Nutrition* 67 (1), S. 71–75.

Kliwer, S. A.; Sundseth, S. S.; Jones, S. A.; Brown, P. J.; Wisely, G. B.; Koble, C. S. et al. (1997): Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 9, S. 4318–4323.

Kobayashi, A.; Kang, M. I.; Okawa, H.; Ohtsuji, M.; Zenke, Y.; Chiba, T. et al. (2004): Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (16), S. 7130–7139.

Koh, K.; Kim, J.; Jang, Y. J.; Yoon, K.; Cha, Y.; Lee, H. J.; Kim, J. (2011): Transcription factor Nrf2 suppresses LPS-induced hyperactivation of BV-2 microglial cells. In: *Journal of Neuroimmunology* 233 (1-2), S. 160–167.

Kohlert, C.; van Rensen, I.; März, R.; Schindler, G.; Graefe, E. U.; Veit, M. (2000): Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. In: *Planta Medica* 66, S. 495–505.

Kokame, K.; Kato, H.; Miyata, T. (2001): Identification of ERSE-II, a New cis-Acting Element Responsible for the ATF6-dependent Mammalian Unfolded Protein Response. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (12), S. 9199–9205.

Kommission der Europäischen Gemeinschaft (2001): Richtlinie 2001/93/EG der Kommission vom 9. November 2001 zur Änderung der Richtlinie 91/630/EWG über Mindestanforderungen für den Schutz von Schweinen. In: *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften* 316, S. 36–38.

Kong, X. F.; Wu, G. Y.; Liao, Y. P.; Hou, Z. P.; Liu, H. J.; Yin, F. G. et al. (2007): Effects of Chinese herbal ultra-fine powder as a dietary additive on growth performance, serum metabolites and intestinal health in early-weaned piglets. In: *Livestock Science* 108 (1-3), S. 272–275.

Koumenis, C.; Naczki, C.; Koritzinsky, M.; Rastani, S.; Diehl, A.; Sonenberg, N. et al. (2002): Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α . In: *Molecular and Cellular Biology* 22, S. 7405–7416.

Kris-Etherton, P. M.; Lefevre, M.; Beecher, G. R.; Gross, M. D.; Keen, C. L.; Etherton, T. D. (2004): Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. In: *Annual Review of Nutrition* 24 (1), S. 511–538.

Kwak, M. K.; Wakabayashi, N.; Itoh, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. (2002): Modulation of Gene Expression by Cancer Chemopreventive Dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 Pathway. Identification of novel gene clusters for cell survival. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (10), S. 8135–8145.

Lai, Y. S.; Chen, W. C.; Ho, C. T.; Lu, K. H.; Lin, S. H.; Tseng, H. C. et al. (2014): Garlic essential oil protects against obesity-triggered nonalcoholic fatty liver disease through modulation of lipid metabolism and oxidative stress. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 62 (25), S. 5897–5906.

Lalles, J. P. (2008): Nutrition and gut health of the young pig around weaning: what news? In: *Archiva Zootechnica* 11 (1), S. 5–15.

Lalles, J. P.; Boudry, G.; Favier, C.; Le Floc'H, N.; Luron, I.; Montagne, L. et al. (2004): Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. In: *Animal Research* 53 (4), S. 301–316.

Lee, D. F.; Kuo, H. P.; Liu, M.; Chou, C. K.; Xia, W.; Du, Y. et al. (2009): KEAP1 E3 Ligase-Mediated Downregulation of NF- κ B Signaling by Targeting IKK β . In: *Molecular Cell* 36 (1), S. 131–140.

Lee, I. S.; Lim, J.; Gal, J.; Kang, J. C.; Kim, H. J.; Kang, B. Y.; Choi, H. J. (2011): Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells. In: *Neurochemistry International* 58 (2), S. 153–160.

Lee, J. M.; Johnson, J. A. (2004): An Important Role of Nrf2-ARE Pathway in the Cellular Defense Mechanism. In: *Journal of Biochemistry and molecular biology* 37 (2), S. 139–143.

Lee, K.; Tirasophon, W.; Shen, X.; Michalak, M.; Prywes, R.; Okada, T. et al. (2002): IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. In: *Genes & Development* 16, S. 452–466.

Lee, K. W.; Everts, H.; Beynen, A. C. (2004): Essential Oils in Broiler Nutrition. In: *International Journal of Poultry Science* 3 (12), S. 738–752.

Lehmann, J. M.; Lenhard, J. M.; Oliver, B.B; Ringold, G. M.; Kliewer, S. A. (1997): Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal antiinflammatory drugs. In: *Journal of Biological Chemistry* 272, S. 3406–3410.

Lemberger, T.; Saladin, R.; Va'zquez, M.; Assimacopoulos, F.; Staels, B.; Desvergne, B. et al. (1996): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. In: *The journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 3, S. 1764–1769.

Lenardo, M.; Siebenlist, U. (1994): Bcl-3-mediated nuclear regulation of the NF- κ B trans-activating factor. In: *Immunology Today* 15 (4), S. 145–147.

Lewandowska, U.; Szewczyk, K.; Hrabec, E.; Janecka, A.; Gorlach, S. (2013): Overview of Metabolism and Bioavailability Enhancement of Polyphenols. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (50), S. 12183–12199.

Li, A. N.; Li, S.; Zhang, Y. J.; Xu, X. R.; Chen, Y. M.; Li, H. B. (2014a): Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. In: *Nutrients* 6 (12), S. 6020–6047.

Li, J.; Hua, Y.; Ji, P.; Yao, W.; Zhao, H.; Zhong, L.; Wei, Y. (2016): Effects of volatile oils of *Angelica sinensis* on an acute inflammation rat model. In: *Pharmaceutical biology* 54 (9), S. 1881–1890.

Li, J.; Zhang, X.; Huang, H. (2014b): Protective effect of linalool against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice. In: *International immunopharmacology* 23 (2), S. 523–529.

Li, W.; Khor, T. O.; Xu, C.; Shen, G.; Jeong, W. S.; Yu, S.g; Kong, A. N. (2008): Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis. In: *Biochemical Pharmacology* 76 (11), S. 1485–1489.

Liao, B. C.; Hsieh, C. W.; Liu, Y. C.; Tzeng, T. T.; Sun, Y. W.; Wung, B. S. (2008): Cinnamaldehyde inhibits the tumor necrosis factor- α -induced expression of cell adhesion molecules in endothelial cells by suppressing NF- κ B activation: Effects upon I κ B and Nrf2. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 229 (2), S. 161–171.

Lin, C. T.; Chen, C. J.; Lin, T. Y.; Tung, J. C.; Wang, S. Y. (2008): Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. In: *Bioresource Technology* 99 (18), S. 8783–8787.

Liu, C. Y.; Kaufman, R. J. (2003): The unfolded protein response. In: *Journal of Cell Science* 116 (10), S. 1861–1862.

Liu, C. Y.; Wong H. N.; Schauerte J. A.; Kaufman R. J. (2002): The Protein Kinase/Endoribonuclease IRE1 α That Signals the Unfolded Protein Response Has a Luminal N-terminal Ligand-independent Dimerization Domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (21), S. 18346–18356.

Liu, G. H.; Qu, J.; Shen, X. (2008): NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (5), S. 713–727.

- Liu, W.; Kulkarni, K.; Hu, M. (2013): Gender-dependent differences in uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase have implications in metabolism and clearance of xenobiotics. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 9 (12), S. 1555–1569.
- Lomonosova, E.; Chinnadurai, G. (2008): BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. In: *Oncogene* 27, S2-S19.
- Luehring, M.; Blank, R.; Wolffram, S. (2011): Vitamin E-sparing and vitamin E-independent antioxidative effects of the flavonol quercetin in growing pigs. In: *Animal Feed Science and Technology* 169 (3-4), S. 199–207.
- Lundasen, T.; Hunt, M. C.; Nilsson, L. M.; Sanyal, S.; Angelin, B.; Alexson, S. E. H.; Rudling, M. (2007): PPARalpha is a key regulator of hepatic FGF21. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (2), S. 437–440.
- Lust, S.; Vanhoecke, B.; van Gele, M.; Boelens, J.; van Melckebeke, H.; Kaileh, M. et al. (2009): Xanthohumol Activates the Proapoptotic Arm of the Unfolded Protein Response in Chronic Lymphocytic Leukemia. In: *Anticancer Research* 29, S. 3797–3806.
- Ma, Q. (2013): Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. In: *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 53 (1), S. 401–426.
- Ma, Y. (2003): Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (37), S. 34864–34873.
- Ma, Y.; Hendershot, L. M. (2003): Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (37), S. 34864–34873.
- Makris, D. P.; Boskou, G.; Andrikopoulos, N. K.; Kefalas, P. (2008): Characterisation of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera* cv. Roditis) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. In: *European Food Research and Technology* 226 (5), S. 1075–1079.

Malizia, R. A.; Molli, J. S.; Cardell, D. A.; Grau, R. J. A. (1999): Essential Oil of Hop Cones (*Humulus lupulus* L.). In: *Journal of Essential Oil Research* 11 (1), S. 13–15.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jime'nez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 79, S. 727–747.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. (2005): Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. In: *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230S–242S.

Matal, J.; Jancova, P.; Siller, M.; Masek, V., Anzenbacherova, E.; Anzenbacher, P. (2008): Interspecies comparison of the glucuronidation process in the man, monkey, pig, dog and rat. In: *Neuroendocrinology Letters* 29, S. 738–743.

May, M. J.; Ghosh, S. (1998): Signal transduction through NF- κ B. In: *Immunology Today* 19 (2), S. 80–88.

McCracken, B. A.; Gaskins, H. R.; Ruwe-Kaiser, P. J.; Klasing, K. C.; Jewell, D. E. (1995): Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning. In: *The Journal of Nutrition*, S. 2838–2845.

McCullough, K. D.; Martindale, J. L.; Klotz, L. O.; Aw, T. Y.; Holbrook, N. J. (2001): Gadd153 Sensitizes Cells to Endoplasmic Reticulum Stress by Down-Regulating Bcl2 and Perturbing the Cellular Redox State. In: *Molecular and Cellular Biology* 21, S. 1249–1259.

McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. (2003): Keap1-dependent Proteasomal Degradation of Transcription Factor Nrf2 Contributes to the Negative Regulation of Antioxidant Response Element-driven Gene Expression. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (24), S. 21592–21600.

McMahon, M.; Thomas, N.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Hayes, J. D. (2004): Redox-regulated Turnover of Nrf2 Is Determined by at Least Two Separate Protein Domains, the Redox-sensitive Neh2 Degron and the Redox-insensitive Neh6 Degron. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (30), S. 31556–31567.

- Mercurio, F.; Zhu, H.; Murray, B.; Shevchenko, A.; Bennett, B.; Li, J. et al. (1997): IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. In: *Science* VOL. 278, S. 860–866.
- Meyer, A. S.; Yi, O. S.; Pearson, D. A.; Waterhouse, A. L.; Frankel, E. N. (1997): Inhibition of human lowdensity lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, S. 1638–1643.
- Miguel, M. G. (2010): Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. In: *Molecules* 15 (12), S. 9252–9287.
- Mitsuishi, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2012): The Keap1–Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism. In: *Frontiers in Oncology* 2, 200.
- Moeser, A. J.; Klok, C. V.; Ryan, K. A.; Wooten, J. G.; Little, D.; Cook, V. L.; Blikslager, A. T. (2006): Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. In: *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (1), G173-G181.
- Molina, N.; Bolin, A. P.; Otton, R. (2015): Green tea polyphenols change the profile of inflammatory cytokine release from lymphocytes of obese and lean rats and protect against oxidative damage. In: *International immunopharmacology* 28 (2), S. 985–996.
- Montagne, L.; Boudry, G.; Favier, C.; Le Huërou-Luron, I.; Lallès, J. P.; Sève, B. (2007): Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. In: *British Journal of Nutrition* 97 (01), S. 45–57.
- Moon, D. O.; Park, S. Y.; Choi, Y. H.; Ahn, J. S.; Kim, G. Y. (2011): Guggulsterone sensitizes hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through the induction of CHOP-dependent DR5: Involvement of ROS-dependent ER-stress. In: *Biochemical Pharmacology* 82 (11), S. 1641–1650.
- Moreno-Indias, I.; Sánchez-Alcoholado, L.; Pérez-Martínez, P.; Andrés-Lacueva, C.; Cardona, F.; Tinahones, F.; Queipo-Ortuño, M. I. (2016): Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. In: *Food & function* 7 (4), S. 1775–1787.

- Mori, K.; Ma, W.; Gething, M. J.; Sambrook, J. (1993): A transmembrane protein with a cdc2+CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. In: *Cell* 74 (4), S. 743–756.
- Motohashi, H.; O'Connor, T.; Katsuoka, F.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (2002): Integration and diversity of the regulatory network composed of Maf and CNC families of transcription factors. In: *Gene* 294 (1-2), S. 1–12.
- Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2004): Nrf2–Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. In: *Trends in Molecular Medicine* 10 (11), S. 549–557.
- Mugford, C. A.; Kedderis, G. L. (1998): Sex-dependent metabolism of xenobiotics. In: *Drug Metabolism Reviews* 30 (3), S. 441–498.
- Nioi, P.; Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Pickett, C. B. (2005): The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (24), S. 10895–10906.
- Nishimura, T.; Nakatake, Y.; Konishi, M.; Itoh, N. (2000): Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1492 (1), S. 203–206.
- Nishitoh, H.; Matsuzawa, A.; Tobiume, K.; Saegusa, K.; Takeda, K.; Inoue, K. et al. (2002): ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. In: *Genes & Development* 16, S. 1345–1355.
- Noh, J. S.; Park, C. H.; Yokozawa, T. (2011): Treatment with oligonol, a low-molecular polyphenol derived from lychee fruit, attenuates diabetes-induced hepatic damage through regulation of oxidative stress and lipid metabolism. In: *British Journal of Nutrition* 106 (07), S. 1013–1022.
- Nowakowska, Z. (2007): A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. In: *European Journal of Medicinal Chemistry* 42 (2), S. 125–137.
- Oldham, K. M.; Bowen, P. E. (1998): Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? In: *Journal of the American Dietetic Association* 98, S. 1001–1008.

Oyadomari, S.; Mori, M. (2004): Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. In: *Cell Death and Differentiation* 11, S. 381–389.

Padmanabhan, B.; Tong, K. I.; Ohta, T.; Nakamura, Y.; Scharlock, M.; Ohtsuji, M. et al. (2006): Structural Basis for Defects of Keap1 Activity Provoked by Its Point Mutations in Lung Cancer. In: *Molecular Cell* 21 (5), S. 689–700.

Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. In: *Oncogene* 18 (49), S. 6853–6866.

Pahl, H. L.; Baeuerle, P. A. (1995): A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappaB. In: *The EMBO Journal* 14, S. 2580–2588.

Pan, Q. R.; Ren, Y. L.; Liu, W. X.; Hu, Y. J.; Zheng, J. S.; Xu, Y.; Wang, G. (2015): Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. In: *Nutrition Research* 35 (7), S. 576–584.

Panchal, S. K.; Poudyal, H. Brown, L. (2012): Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. In: *The Journal of nutrition* 142 (6), S. 1026–1032.

Park, H. J.; Lee, J.-Y.; Chung, M.-Y.; Park, Y.-K.; Bower, A. M.; Koo, S. I. et al. (2011): Green Tea Extract Suppresses NF B Activation and Inflammatory Responses in Diet-Induced Obese Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis. In: *Journal of Nutrition* 142 (1), S. 57–63.

Pastrana-Bonilla, E.; Akoh, C. C.; Sellappan, S.; Krewer, G. (2003): Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Muscadine Grapes. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 51 (18), S. 5497–5503.

Patel, R.; Maru, G. (2008): Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. In: *Free Radical Biology and Medicine* 44 (11), S. 1897–1911.

- Patil, C.; Walter, P. (2001): Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. In: *Current Opinion in Cell Biology* 13 (3), S. 349–355.
- Paton, A. W.; Beddoe, T.; Thorpe, C. M.; Whisstock, J. C.; Wilce, M. C. J.; Rossjohn, J. et al. (2006): AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. In: *Nature* 443 (7111), S. 548–552.
- Pié, S.; Lallès, J. P.; Blazy, F.; Laffitte, J.; Sève, B.; Oswald, I. P. (2003): Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. In: *The Journal of Nutrition*, S. 641–647.
- Pié, S.; Lallès, J. P.; Blazy, F.; Laffitte, J.; Sève, B.; Oswald, I. P. (2004): Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. In: *Journal of Nutrition* 134, S. 641–647.
- Pluske, J. R. (2013): Feed- and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. In: *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4 (1), S. 1–7.
- Pluske, J. R.; Hampson, D. J.; Williams, I. H. (1997): Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. In: *Livestock Production Science* 51 (1-3), S. 215–236.
- Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M.; Ignacimuthu, S. (2006): In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. In: *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6 (1), 39.
- Queipo-Ortuño, M. I.; Boto-Ordóñez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J. M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R. et al. (2012): Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. In: *The American journal of clinical nutrition* 95 (6), S. 1323–1334.
- Rahman, I.; Biswas, S. K.; Kirkham, P. A. (2006): Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. In: *Biochemical Pharmacology* 72 (11), S. 1439–1452.

- Rakhshandehroo, M.; Knoch, B.; Müller, M.; Kersten, S. (2010): Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Target Genes. In: *PPAR Research* 2010 (5), S. 1–20.
- Rangasamy, T.; Guo, J.; Mitzner, W. A.; Roman, J.; Singh, A.; Fryer, A. D. et al. (2005): Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. In: *Journal of Experimental Medicine* 202 (1), S. 47–59.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. In: *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10), S. 1231–1237.
- Reinboth, M.; Wolffram, S.; Abraham, G.; Ungemach, F. R.; Cermak, R. (2010): Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. In: *The British journal of nutrition* 104 (2), S. 198–203.
- Renaud, H. J.; Cui, J. Y.; Khan, M.; Klaassen, C. D. (2011): Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124 (2), S. 261–277.
- Reuter, S.; Gupta, S. C.; Chaturvedi, M. n M.; Aggarwal, B. B. (2010): Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? In: *Free Radical Biology and Medicine* 49 (11), S. 1603–1616.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Bolwell, P.G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. (1995): The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. In: *Free Radical Research Vol. 22. NO. 4*, S. 375–383.
- Ringseis, R.; Wege, N.; Wen, G.; Rauer, C.; Hirche, F.; Kluge, H.; Eder, K. (2009): Carnitine synthesis and uptake into cells are stimulated by fasting in pigs as a model of nonproliferating species. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (11), S. 840–847.
- Roese, G.; Taylor, G. (2006): Basic pig husbandry - the weaner. In: *Primefact* 72, S. 1–6.

Romics, L.; Kodys, K.; Dolganiuc, A.; Graham, L.; Velayudham, A.; Mandrekar, P.; Szabo, G. (2004): Diverse regulation of NF- κ B and peroxisome proliferator-activated receptors in murine nonalcoholic fatty liver. In: *Hepatology* 40 (2), S. 376–385.

Romo Vaquero, M.; Garcia Villalba, R.; Larrosa, M.; Yanez-Gascon, M. J.; Fromentin, E.; Flanagan, J. et al. (2013): Bioavailability of the major bioactive diterpenoids in a rosemary extract: metabolic profile in the intestine, liver, plasma, and brain of Zucker rats. In: *Molecular nutrition & food research* 57 (10), S. 1834–1846.

Ron, D.; Walter, P. (2007): Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (7), S. 519–529.

Rothwarf, DM.; Zandi, E.; Natoli, G.; Karin, M. (1998): IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. In: *Nature* 395, S. 297–300.

Ruiz, M. L.; Mottino, A. D.; Catania, V. A.; Vore, M. (2013): Hormonal Regulation of Hepatic Drug Biotransformation and Transport Systems. In: *Comprehensive Physiology* 3, S. 1721–1740.

Ruiz, P. A.; Haller, D. (2006): Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NFkappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. In: *Journal of Nutrition* 136, S. 664–671.

Rutkowski, D.Thomas; Kaufman, Randal J. (2004): A trip to the ER: coping with stress. In: *Trends in Cell Biology* 14 (1), S. 20–28.

Saengtienchai, A.; Ikenaka, Y.; Nakayama, S. M. M.; Mizukawa, H.; Kakehi, M.; Bortey-Sam, N. et al. (2014): Identification of interspecific differences in phase II reactions: determination of metabolites in the urine of 16 mammalian species exposed to environmental pyrene. In: *Environmental toxicology and chemistry* 33 (9), S. 2062–2069.

Sakurai, H.; Chiba, H.; Miyoshi, H.; Sugita, T.; Toriumi, W. (1999): IkB Kinases Phosphorylate NF- κ B p65 Subunit on Serine 536 in the Transactivation Domain. In: *Journal of Biological Chemistry* 274, S. 30353–30356.

Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. (1995): Polyphenolic Flavanols as Scavengers of Aqueous Phase Radicals and as

Chain-Breaking Antioxidants. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 322, no. 2, S. 339–346.

Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C. T.; Rehder, V. L. G. (2004): Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. In: *Brazilian Journal of Microbiology* 35, S. 275–280.

Sato, M.; Ramarathnam, N.; Suzuki, Y.; Ohkubo, T.; Takeuchi, M.; Ochi, H. (1996): Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, S. 37–41.

Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. (2005): Polyphenols: antioxidants and beyond. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 215S-217S.

Schaap, F. G.; Kremer, A. E.; Lamers, W. H.; Jansen, P. L.M.; Gaemers, I. C. (2013): Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. In: *Biochimie* 95 (4), S. 692–699.

Schöne, F. (2003): Stand und Möglichkeiten der Anwendung von Heil- und Gewürzpflanzen in Thüringen. In: *Bericht TLL, Jena*, S. 1–54.

Schöne, F.; Vetter, A.; Hartung, H.; Bergmann, H.; Biertümpfel, A.; Richter, G. et al. (2006): Effects of essential oils from fennel (*Foeniculi aetheroleum*) and caraway (*Carvi aetheroleum*) in pigs. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90 (11-12), S. 500–510.

Schröder, M.; Kaufman, R. J. (2005a): ER stress and the unfolded protein response. In: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 569 (1-2), S. 29–63.

Schröder, M.; Kaufman, R. J. (2005b): The mammalian unfolded protein response. In: *Annual Review of Biochemistry* 74 (1), S. 739–789.

Scorrano, L.; Oakes, S. A.; Opferman, J. T.; Cheng, E. H.; Sorcinelli, M. D.; Pozzan, T.; Korsmeyer, S., J. (2003): BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca²⁺: A Control Point for Apoptosis. In: *Science* 300 (5616), S. 135–139.

Seeram, N.; Adams, L.; Henning, S.; Niu, Y.; Zhang, Y.; Nair, M.; Heber, D. (2005): In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (6), S. 360–367.

Selye, H. (1976): Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. In: *CMA Journal*, vol. 115, S. 53–56.

Sen, R.; Baltimore, D. (1986): Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. In: *Cell* 46 (5), S. 705–716.

Senftleben, U.; Cao, Y.; Xiao, G.; Greten, F.; Krähn, G.; Bonizzi, G. et al. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. In: *Science* 293, S. 1495–1499.

Shah, B. N.; Panchal, M. A.; Gohil, N.; Nayak, B. S.; Modi, D. C. (2010): Phyto-Pharmacological Profile of Humulus Lupulus. In: *Pharmacologyonline* 1, S. 719–736.

Shen, J.; Chen, X.; Hendershot, L.; Prywes, R. (2002): ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. In: *Developmental Cell* 3 (1), S. 99–111.

Shi, J.; Yu, J.; Pohorly, J. E.; Kakuda, Y. (2003): Polyphenolics in Grape Seeds—Biochemistry and Functionality. In: *Journal of Medical Food* 6 (4), S. 291–299.

Shimomura, I.; Shimano, H.; Horton, J. D.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. (1997): Differential Expression of Exons 1a and 1c in mRNAs for Sterol Regulatory Element Binding Protein-1 in Human and Mouse Organs and Cultured Cells. In: *Journal of Clinical Investigation* 99 (5), S. 846–854.

Shoulders, M. D.; Ryno, L. M.; Genereux, J. C.; Moresco, J. J.; Tu, P. G.; Wu, C. et al. (2013): Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. In: *Cell Reports* 3 (4), S. 1279–1292.

- Sidwell, C. G.; Salwin, H.; Benca, M.; Mitchell, J. H. (1954): The use of thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. In: *THE JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY*, vol. 31, S. 603–606.
- Singelton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: *Methods in Enzymology* 299, S. 152–178.
- Singh, V.; Jain, M.; Misra, A.; Khanna, V.; Rana, M.; Prakash, P. et al. (2013): Curcuma oil ameliorates hyperlipidaemia and associated deleterious effects in golden Syrian hamsters. In: *British Journal of Nutrition* 110 (03), S. 437–446.
- Smith, M. G.; Jordan, D.; Chapman, T. A.; Chin, J.J.-C.; Barton, M. D.; Do, T. N. et al. (2010): Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. In: *Veterinary Microbiology* 145 (3-4), S. 299–307.
- Soković, M.; Marin, P. D.; Brkić, D.; van Griensven, L. (2007): Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. In: *Food* 1 (1), S. 220–226.
- Song, M. Y.; Kim, E. K.; Moon, W. S.; Park, J. W.; Kim, H. J.; So, H. S. et al. (2009): Sulforaphane protects against cytokine- and streptozotocin-induced β -cell damage by suppressing the NF- κ B pathway. In: *Toxicology and Applied Pharmacology* 235 (1), S. 57–67.
- Spreeuwenberg, M. A.; Verdonk, J. M.; Gaskins, H. R.; Verstegen, M. W. (2001): Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. In: *Journal of Nutrition* 131, S. 1520–1527.
- Staels, B.; Koenig, W.; Habib, A.; Merval, R.; Lebret, M.; Torra, I. P. et al. (1998): Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. In: *Nature*, vol. 393, no. 25, S. 790–793.
- Stefanson, A.; Bakovic, M. (2014): Dietary Regulation of Keap1/Nrf2/ARE Pathway: Focus on Plant-Derived Compounds and Trace Minerals. In: *Nutrients* 6 (9), S. 3777–3801.

Stevens, J. F.; Page, J. E. (2004): Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! In: *Phytochemistry* 65 (10), S. 1317–1330.

Su, J. L.; Simmons, C. J.; Wisely, B.; Ellis, B.; Winegar, D. A. (1998): Monitoring of PPAR Alpha Protein Expression in Human Tissue by the Use of PPAR Alpha-Specific MAbs. In: *Hybridoma* 17, S. 47–53.

Sun, Z.; Andersson, R. (2002): NF-[kappa]B Activation and Inhibition: A Review. In: *SHOCK, Vol. 18, No. 2*, S. 99–106.

Surai, P. F. (2014): Polyphenol compounds in the chicken/animal diet: from the past to the future. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98 (1), S. 19–31.

Szegezdi, E.; Logue, S. E.; Gorman, A. M.; Samali, A. (2006): Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. In: *Embo Reports* 7 (9), S. 880–885.

Tabanca, N.; Ma, G.; Pasco, D. S.; Bedir, E.; Kirimer, N.; Baser, K. H. C. et al. (2007): Effect of essential oils and isolated compounds from *Pimpinella* species on NF- κ B: a target for antiinflammatory therapy. In: *Phytotherapy Research* 21 (8), S. 741–745.

Tait, S. W. G.; Green, D. R. (2010): Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9), S. 621–632.

Takahashi, N.; Yao, L.; Kim, M.; Sasako, H.; Aoyagi, M.; Shono, J. et al. (2013): Dill seed extract improves abnormalities in lipid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) activation in diabetic obese mice. In: *Molecular nutrition & food research* 57 (7), S. 1295–1299.

Tam, A. B.; Mercado, E. L.; Hoffmann, A.; Niwa, M.; Koritzinsky, M. (2012): ER Stress Activates NF- κ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. In: *PLoS ONE* 7 (10), e45078.

Tang, W.; Wang, L.; Wang, Y.; Zong, Z.; Gao, Z.; Liu, X. et al. (2014): Peroxisome proliferator-activated receptor- α activation protects against endoplasmic reticulum

stress-induced HepG2 cell apoptosis. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 385 (1-2), S. 179–190.

Tangney, C. C.; Rasmussen, H. E. (2013): Polyphenols, Inflammation, and Cardiovascular Disease. In: *Current Atherosclerosis Reports* 15 (5), 324.

Terra, X.; Montagut, G.; Bustos, M.; Llopiz, N.; Ardèvol, A.; Bladé, C. et al. (2009): Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. In: *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (3), S. 210–218.

Thomas, M.; George, N. I.; Saini, U. T.; Patterson, T. A.; Hanig, J. P.; Bowyer, J. F. (2010): Endoplasmic reticulum stress responses differ in meninges and associated vasculature, striatum, and parietal cortex after a neurotoxic amphetamine exposure. In: *Synapse* 64 (8), S. 579–593.

Tkachev, V. O.; Menshchikova, E. B.; Zenkov, N. K. (2011): Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. In: *Biochemistry Moscow* 76 (4), S. 407–422.

Torabian, S.; Haddad, E.; Rajaram, S.; Banta, J.; Sabaté, J. (2009): Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. In: *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 22 (1), S. 64–71.

Tran, K.; Merika, M.; Thanos, D. (1997): Distinct functional properties of IkappaB alpha and IkappaB beta. In: *Molecular and Cellular Biology* 17, S. 5386–5399.

Tyagi, S.; Singh, G.; Sharma, A.; Aggarwal G. (2010): Phytochemicals as Candidate Therapeutics: An Overview. In: *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research Vol. 3*, S. 53–55.

Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H. P.; Ron, D. (2000): Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. In: *Science* 287, S. 664–666.

van Beers-Schreurs, H.M.G.; Vellenga, L.; Wensing, Th.; Breukink, H. J. (1992): The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets; a review. In: *Veterinary Quarterly* 14 (1), S. 29–34.

Venugopal, R.; Jaiswal, A. K. (1998): Nrf2 and Nrf2 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. In: *Oncogene* 17, S. 3145–3156.

Viuda-Martos, M.; Navajas, Y. R.; Zapata, E. S.; Fernández-López, J.; Pérez-Alvarez, J. A. (2010): Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. In: *Flavour and Fragrance Journal* 25, S. 13–19.

Wahli, W.; Braissant, O.; Desvergne, B. (1995): Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... In: *Chemistry & Biology* 2 (5), S. 261–266.

Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M.-I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M. et al. (2004): Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7), S. 2040–2045.

Walia, K.; Argüello, H.; Lynch, H.; Leonard, F. C.; Grant, J.; Yearsley, D. et al. (2017): Effect of strategic administration of an encapsulated blend of formic acid, citric acid, and essential oils on Salmonella carriage, seroprevalence, and growth of finishing pigs. In: *Preventive veterinary medicine* 137 (Pt A), S. 28–35.

Walter, P.; Ron, D. (2011): The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. In: *Science* 334, S. 1081–1086.

Wang, D. F.; Zhang, N. Y.; Peng, Y. Z.; Qi, D. S. (2012): Interaction of zearalenone and soybean isoflavone in diets on the growth performance, organ development and serum parameters in prepubertal gilts. In: *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 96 (5), S. 939–946.

Wang, H.; Qiang, L.; Farmer, S. R. (2008): Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (1), S. 188–200.

- Wang, X.; Yang, L.; Yang, X.; Tian, Y. (2014): In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (8), S. 1693–1700.
- Wang, Y.; Shen, J.; Arenzana, N.; Tirasophon, W.; Kaufman, R. J.; Prywes, R. (2000): Activation of ATF6 and an ATF6 DNA Binding Site by the Endoplasmic Reticulum Stress Response. In: *Journal of Biological Chemistry* 275, S. 27013–27020.
- Wild, A. C.; Moinova, H. R.; Mulcahy, R. T. (1999): Regulation of γ -glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by transcription factor Nrf2. In: *Journal of Biological Chemistry* 274, S. 33627–33636.
- Willson, T. M.; Brown, P. J.; Sternbach, D. D.; Henke, B. R. (2000): The PPARs: From Orphan Receptors to Drug Discovery. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 43 (4), S. 527–550.
- Wolfson, J. J.; May, K. L.; Thorpe, C. M.; Jandhyala, D. M.; Paton, J. C.; Paton, A. W. (2008): Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. In: *Cellular Microbiology* 10 (9), S. 1775–1786.
- Wu, S.; Tan, M.; Hu, Y.; Wang, J.-L.; Scheuner, D.; Kaufman, R. J. (2004): Ultraviolet light activates NF κ B through translational inhibition of I κ B α synthesis. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (33), S. 34898–34902.
- Xia, E. Q.; Deng, G. F.; Guo, Y. J.; Li, H. B. (2010): Biological Activities of Polyphenols from Grapes. In: *International Journal of Molecular Sciences* 11 (2), S. 622–646.
- Xiao, G.; Harhaj, E.; Sun, S. (2001): NF- κ B-inducing kinase regulates the processing of NF- κ B2 p100. In: *Molecular Cell* 7, S. 401–409.
- Xu, C.; Shen, G.; Chen, C.; G  linas, C.; Kong, A. N. T. (2005): Suppression of NF- κ B and NF- κ B-regulated gene expression by sulforaphane and PEITC through I κ B α , IKK pathway in human prostate cancer PC-3 cells. In: *Oncogene* 24 (28), S. 4486–4495.
- Yamamoto, K.; Yoshida, H.; Kokame, K.; Kaufman, R. J.; Mori, K. (2004): Differential Contributions of ATF6 and XBP1 to the Activation of Endoplasmic Reticulum Stress-

Responsive cis-Acting Elements ERSE, UPRE and ERSE-II. In: *Journal of Biochemistry* 136 (3), S. 343–350.

Yamamoto, T.; Suzuki, T.; Kobayashi, A.; Wakabayashi, J.; Maher, J.; Motohashi, H.; Yamamoto, M. (2008): Physiological Significance of Reactive Cysteine Residues of Keap1 in Determining Nrf2 Activity. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (8), S. 2758–2770.

Yamazaki, H.; Hiramatsu, N.; Hayakawa, K.; Tagawa, Y.; Okamura, M.; Ogata, R. et al. (2009): Activation of the Akt-NF- κ B Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response. In: *The Journal of Immunology* 183 (2), S. 1480–1487.

Yamazaki, K.; Suzuki, M.; Itoh, T.; Yamamoto, K.; Kanemitsu, M.; Matsumura, C. et al. (2011): Structural basis of species differences between human and experimental animal CYP1A1s in metabolism of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. In: *Journal of Biochemistry* 149 (4), S. 487–494.

Yang, F.; Tang, E.; Guan, K.; Wang, C.-Y. (2003): IKK Plays an Essential Role in the Phosphorylation of RelA/p65 on Serine 536 Induced by Lipopolysaccharide. In: *The Journal of Immunology* 170 (11), S. 5630–5635.

Yang, Y.; Gocke, A. R.; Lovett-Racke, A.; Drew, P. D.; Racke, M. K. (2008): PPAR Alpha Regulation of the Immune Response and Autoimmune Encephalomyelitis. In: *PPAR Research* 2008 (1), S. 1–6.

Yao, J.; Zhang, B.; Ge, C.; Peng, S.; Fang, J. (2015): Xanthohumol, a Polyphenol Chalcone Present in Hops, Activating Nrf2 Enzymes To Confer Protection against Oxidative Damage in PC12 Cells. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 63 (5), S. 1521–1531.

Ye, J.; Rawson, R. B.; Komuro, R.; Chen, X.; Davé, U. P.; Prywes, R. et al. (2000): ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs. In: *Molecular Cell* 6 (6), S. 1355–1364.

Yin, J.; Ren, W.; Wu, X.; Yang, G.; Wang, J.; Li, T. et al. (2013): Oxidative stress-mediated signaling pathways: A review. In: *Journal of Food Agriculture and Environment* 11, S. 132–139.

- Yin, J.; Wu, M. M.; Xiao, H.; Ren, W. K.; Duan, J. L.; Yang, G. et al. (2014): Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. In: *Journal of Animal Science* 92, S. 612–619.
- Yoon, W. J.; Moon, J. Y.; Song, G.; Lee, Y. K.; Han, M. S.; Lee, J. S. et al. (2010): Artemisia fukudo essential oil attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF- κ B and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. In: *Food and Chemical Toxicology* 48 (5), S. 1222–1229.
- Yoshida, H.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Mori, K. (1998): Identification of the cis-Acting Endoplasmic Reticulum Stress Response Element Responsible for Transcriptional Induction of Mammalian Glucose-regulated Proteins. In: *Journal of Biological Chemistry* 273, S. 33741–33749.
- Yoshida, H.; Okada, T.; Haze, K.; Yanagi, H.; Yura, T.; Negishi, M.; Mori, K. (2000): ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the cis-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. In: *Molecular and Cellular Biology* 20, S. 6755–6767.
- Yoshida, H.; Oku, M.; Suzuki, M.; Mori, K. (2006): pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. In: *The Journal of Cell Biology* 172 (4), S. 565–575.
- Yoshida, H.; Matsui, T.; Yamamoto, A.; Okada, T.; Mori, K. (2001): XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor. In: *Cell* 107 (7), S. 881–891.
- Yu, K.; Bayona, W.; Kallen, C. B.; Harding, H. P.; Ravera, C. P.; McMahon, G. et al. (1995): Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. In: *Journal of Biological Chemistry* 270, S. 23975–23983.
- Zabel, U.; Baeuerle, P. A. (1990): Purified Human IkappaB Can Rapidly Dissociate the Complex of the NF-kappaB Transcription Factor with Its Cognate DNA. In: *Cell* 61, S. 255–265.
- Zandi, E.; Rothwarf, D.; Delhase, M.; Hayakawa, M.; Karin, M. (1997): The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta,

necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. In: *Cell* 91, S. 243–252.

Zanoli, P.; Zavatti, M. (2008): Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. In: *Journal of Ethnopharmacology* 116 (3), S. 383–396.

Zeng, Z.; Zhang, S.; Wang, H.; Piao, X. (2015): Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. In: *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6 (1), 7.

Zhang, D. D. (2006): Mechanistic Studies of the Nrf2-Keap1 Signaling Pathway. In: *Drug Metabolism Reviews* 38 (4), S. 769–789.

Zhang, H. J.; Jiang, X. R.; Mantovani, G.; Lumbreras, A. E. V.; Comi, M.; Alborali, G. et al. (2016): Modulation of Plasma Antioxidant Activity in Weaned Piglets by Plant Polyphenols. In: *Italian Journal of Animal Science* 13 (2), S. 424–430.

Zhang, K.; Kaufman, R. J. (2008): From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. In: *Nature* 454 (7203), S. 455–462.

Zhang, L.; Wang, A. (2012): Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. In: *Frontiers in Plant Science* 3, 293.

Zhang, X. Q.; Xu, C. F.; Yu, C. H.; Chen, W. X.; Li, Y. M. (2014): Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. In: *World journal of gastroenterology* 20 (7), S. 1768–1776.

Zheng, C.; Yin, Q.; Wu, H. (2010): Structural studies of NF-kB signaling. In: *Cell Research* 21 (1), S. 183–195.

Zhong, H.; May, M. J.; Jimi, E.; Ghosh, S. (2002): The Phosphorylation Status of Nuclear NF-KB Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. In: *Molecular Cell* 9 (3), S. 625–636.

Zhu, L. H.; Zhao, K. L.; Chen, X. L.; Xu, J. X. (2012): Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. In: *Journal of Animal Science* 90, S. 2581–2589.

Zipper, L. M.; Mulcahy, R. T. (2000): Inhibition of ERK and p38 MAP Kinases Inhibits Binding of Nrf2 and Induction of GCS Genes. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 278 (2), S. 484–492.

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation mit dem Titel:
Einfluss von phytoenen Futterkomponenten auf ausgewählte Parameter der
Stressantwort und des Lipidstoffwechsels in der Leber beim Ferkel.

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Ort, Datum

(Maria Sophie Bonarius)

11 Danksagung

In meiner Danksagung möchte ich mich an erster Stelle an Herrn Prof. Dr. Klaus Eder richten. Vielen lieben Dank, dass Sie es mir ermöglicht haben am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie zu promovieren. Danke für das interessante und aktuelle Thema, Ihre Unterstützung und Geduld.

Für die Betreuung möchte ich mich bei Frau Dr. Denise Geßner bedanken. Außerdem bei Frau Dr. Anja Fiesel für die Bereitstellung des Probenmaterials und die fachliche Unterstützung.

Für die tolle Unterstützung im Labor und die vielen aufmunternden Worte möchte ich mich bei Frau Dr. Erika Most, Frau Dr. Aline Couturier, Frau Dr. Janine Keller, Frau Dr. Gaiping Wen und den unersetzlichen TA's herzlich bedanken. Besonders hervorheben möchte ich hier die großartige Hilfe von Anja Marx, Marco Jäger, Helmut Henzel und Frauke Frank. Außerdem hatten auch Frau Dr. Johanna Zeitz und Herr Dr. Robert Ringseis immer ein offenes Ohr für meine Probleme. Vielen Dank für eure Unterstützung.

Zu der schönen Zeit im Institut haben natürlich auch die lustigen und unterhaltsamen Pausen mit den anderen Doktoranden beigetragen. Ich möchte mich bei euch allen für die gemeinsame Zeit bedanken.

Ohne meine Familie und Freunde wäre eine Promotion nicht möglich gewesen. Danke für euren Rückhalt, die Aufmunterungen und Motivation. Danke an meine Schwestern Martha und Anna für das geduldige Lesen meiner Arbeit. Bei meinem Freund Manuel möchte ich mich für seine Ruhe und sein Verständnis bedanken, wenn sich Phasen aller Gemütslagen zwischen Frust und Übermotivation abwechselten und ich ihnen manchmal selbst nur schwer folgen konnte.

Danke!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6688-8

